

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

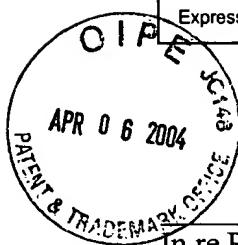
**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Image

04-08-04

W

1652



Express Mail Label No.

Dated: _____

Docket No.: 02901/000J410-US0
(PATENT)**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:
Giuseppina Bestetti et al.

Application No.: 09/891,865

Confirmation No.: 2194

Filed: June 25, 2001

Art Unit: 1652

For: VECTORS, HOST CELLS, AND METHODS
FOR PRODUCTION OF URIDINE
PHOSPHORYLASE AND PURINE
NUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE

Examiner: D.J. Steadman

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

MS Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

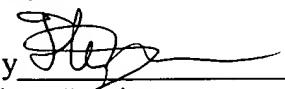
Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

Country	Application No.	Date
Italy	1304500	March 19, 2001

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith.

Dated: April 6, 2004

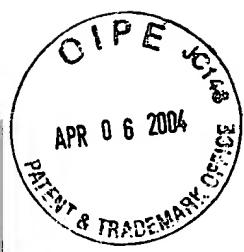
Respectfully submitted,

By 
Flynn Barrison

Registration No.: 53,970
DARBY & DARBY P.C.
P.O. Box 5257
New York, New York 10150-5257
(212) 527-7700
(212) 753-6237 (Fax)
Agent For Applicants

Application No. (if known): 09/891,865

Attorney Docket No.: 02901/000J410-US0



Certificate of Express Mailing Under 37 CFR 1.10

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail, Airbill No. BL983948280US in an envelope addressed to:

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

on April 6, 2004
Date

J. Stantini

Signature

J. Stantini

Typed or printed name of person signing Certificate

Note: Each paper must have its own certificate of mailing, or this certificate must identify each submitted paper.

Claim for Priority and Submission of Documents (1 page);
Certified copy of Italian Application No. 1304500;
Certificate of Express Mailing (1 page); and



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi al brevetto per:

Invenzione Industriale

N.

1304500

rilasciato il

19.03.2001



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito e per la quale è stato rilasciato il brevetto sopraspecificato.

26 MAR. 2004

Roma, li

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotto

Giampietro Carlotto

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO



A. RICHIEDENTE (I)

NORPHARMA SPA

1) Denominazione **VALLEAMBROSIA DI ROZZANO MILANO**

codice

2) Denominazione

Residenza

codice

Città

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **Dragotti Gianfranco ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL**via **Gall. san Babila**

n. 1 c. 4.C città

MILANOcap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n. città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl)

gruppo/sottogruppo

CEPPI BATTERICI RICOMBINANTI PER LA PRODUZIONE DI NUCLEOSIDI NATURALI E DI ANALOGHI MODIFICATIANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI cognome nome

cognome nome

1) **BESTETTI GIUSEPPINA**3) **GHISOTTI DANIELA**2) **CALI' SIMONA**4) **ORSINI GAETANO**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato:
S/R

Data

N° Protocollo

SCIOLGIMENTO RISERVE

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

- Doc. 1) **2** PROV n. pag. **41** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
- Doc. 2) **2** PROV n. tav **15** disegno (obbligatorio se citato in descrizione 1 esemplare)
- Doc. 3) **1** RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
- Doc. 4) **0** RIS designazione inventore
- Doc. 5) **0** RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
- Doc. 6) **0** RIS autorizzazione o atto di cessione
- Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

SCIOLGIMENTO RISERVE
Data N° Protocollo

8) attestati di versamento, totale lire

NOVECENTOQUINDICIMILA.=

obbligatorio

COMPILATO IL **23 12 1998**

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

p.p. NORPHARMA SPA

CONTINUA SINO A SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANO

codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

MI98A 002792

Reg. A

L'anno millenovcento

NOVANTOTTO

il giorno

VENTITRE

del mese di

DECEMBREIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **01** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopriportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

timbro
dell'ufficio

UFFICIALE ROGANTE

CONTONESE MAURIZIO

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01 di totali 01

DOMANDA N.

REG. A

AGGIUNTA M
M198ACO 2792

N.G.

A. RICHIEDENTE (I)

E. INVENTORI DESIGNATI

согноте ноте

cognome nome

95 TONON GIANCARLO

| 06 | ZUFFI GABRIELE

1. **What is the primary purpose of the study?**
The primary purpose of the study is to evaluate the effectiveness of a new treatment for depression compared to a placebo. The study will also assess the safety and side effects of the treatment.

E. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	anagrafe S/R	Data	N° Protocollo
1	U	1	1998-01-01	1	1998-01-01	1
2	U	2	1998-01-01	2	1998-01-01	2
3	U	3	1998-01-01	3	1998-01-01	3
4	U	4	1998-01-01	4	1998-01-01	4

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (II) : P.P. NORPHARMA S.p.A.

ORPHARMA SPA

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA M/98/AOO 2792 REG. ADATA DI DEPOSITO 23/12/1998

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO 07/01/2000

A. RICHIENDENTE (!)

Denominazione NORPHARMA SPAResidenza VALLEAMBROSIA DI ROZZANO MILANO

D. TITOLO

CEPPI BATTERICI RICOMBINANTI PER LA PRODUZIONE DI NUCLEOSIDI NATURALI E DI ANALOGHI MODIFICATI

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Vengono descritti nuovi ceppi di microrganismi procarioti geneticamente modificati in grado di esprimere polipeptidi aventi l'attività enzimatica degli enzimi UdP e PNP; i ceppi in questione possono essere utilizzati direttamente per catalizzare reazioni di transglycosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice con rese particolarmente elevate. Vengono altresì descritti i relativi vettori plasmidici.

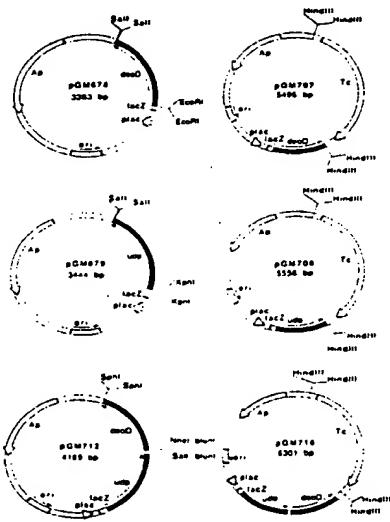


Figura 1. Mappa dei plasmidi in cui sono clonati i geni deoD e ucp di E. coli.



G1

MI98A002792

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale a nome NORPHARMA SPA

La presente invenzione si riferisce a nuovi ceppi batterici geneticamente modificati in grado di esprimere polipeptidi aventi l'attività enzimatica

23 DIC. 1998

5 degli enzimi UdP e PNP; i ceppi in questione possono essere utilizzati per catalizzare reazioni di transglycosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice.

I nucleosidi naturali o gli analoghi modificati hanno importanti applicazioni, sia direttamente che come intermedi, nel campo dei farmaci
10 ad azione antivirale ed antitumorale così come nella preparazione di oligonucleotidi per uso terapeutico e diagnostico.

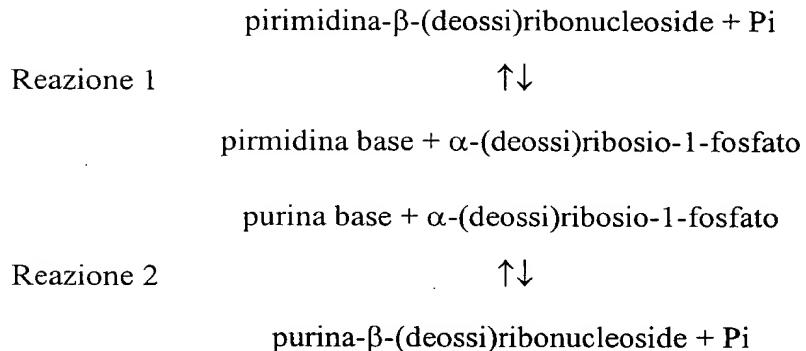
I nucleosidi possono essere preparati con metodi di sintesi chimica che normalmente richiedono numerosi passaggi, procedure di protezione e deprotezione di gruppi labili e l'impiego di reagenti e condizioni operative
15 che a livello industriale possono essere sia difficili da applicare che non economicamente convenienti. Queste reazioni hanno inoltre rese complessive generalmente non elevate a causa anche della formazione di miscele di stereo- e regio-isomeri dalle quali deve essere separato il composto di interesse.

20 Un approccio alternativo per la preparazione di nucleosidi ed analoghi modificati è basato sulla interconversione tra un nucleoside donatore di zucchero ed una base accettrice ad opera di enzimi che catalizzano le reazioni reversibili generali (Hutchinson, Trends Biotechnol. 8, 348-353, 1990) qui sotto riportate nello schema 1:

MI98A002792

91

Schema 1



dove Pi = fosfato organico

La reazione 1 è catalizzata dall'enzima uridina fosforilasi o UdP (E.C.2.4.2.2.) mentre la reazione 2 è catalizzata dall'enzima purina nucleoside fosforilasi o PNP (E.C. 2.4.2.1.).

Gli enzimi UDP e PNP possono essere impiegati singolarmente per catalizzare reazioni di transglycosilazione rispettivamente tra un nucleoside pirimidinico donatore ed una base pirimidinica accettrice o tra un nucleoside purinico donatore ed una base purinica accettrice. Inoltre, quando i due enzimi sono impiegati in combinazione, è possibile trasferire lo zucchero da un nucleoside pirimidinico donatore ad una base accettatrice purinica o pirimidinica così come da un nucleoside purinico donatore ad una base accettatrice pirimidinica o purinica, in dipendenza dei prodotti di partenza utilizzati. In ogni caso, le reazioni di fosforolisi comportano una inversione di configurazione della posizione 1 dello zucchero per dare un α -zucchero-1-fosfato che costituisce il substrato intermedio delle reazioni di transglycosilazione e che viene successivamente trasferito sulla base accettrice, ripristinando la configurazione β originaria.



Queste reazioni enzimatiche possono essere convenientemente condotte a partire dalla miscela di un nucleoside donatore e di una base accettrice in presenza contemporaneamente dei due enzimi e senza isolamento dello zucchero fosfato intermedio oppure in due passaggi comportanti la
5 fosforolisi con formazione dello zucchero fosfato intermedio, il suo isolamento e la successiva condensazione con la base accettrice.

Rispetto alla sintesi chimica, un importante vantaggio delle reazioni di transglycosilazione catalizzate dalle fosforilasi è il mantenimento della stereo-selettività e della regio-selettività per cui il prodotto finale mantiene
10 la configurazione β dei nucleosidi naturali.

Gli enzimi UdP e PNP, che fisiologicamente prendono parte alle reazioni del catabolismo e dell'interconversione dei nucleosidi, sono il prodotto rispettivamente dei geni *udp* e *deoD* largamente distribuiti in natura e sono stati identificati e studiati sia in organismi procariotici che eucariotici
15 (Parks e Agarwal, Enzymes 7, 3^oed., 483-514, Academic Press, New York; Munch-Petersen, Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in micro-organisms. Academic Press, London, 1982).

Dal punto di vista dell'impiego come catalizzatori per la sintesi di nucleosidi ed analoghi modificati, gli enzimi di organismi procariotici sono
20 generalmente preferiti in quanto hanno una minore specificità di substrato e possono catalizzare reazioni di transglycosilazione a partire anche da nucleosidi donatori contenenti zuccheri modificati e da basi accettrici comprendenti sia strutture puriniche o pirimidiniche che sistemi eterociclici azotati diversi (Stoeckler *et al.*, Biochemistry 19, 102-107, 1980; Browska
25 *et al.*, Z.Naturforsch., 45, 59-70, 1990).

Le reazioni di transglicosilazione possono essere condotte utilizzando preparazioni enzimatiche purificate o parzialmente purificate (Krenitsky *et al.*, Biochemistry 20, 3615-3621, 1981; EP-002192) o, in alternativa, utilizzando le cellule batteriche intere di microrganismi selezionati in quanto contenenti gli enzimi necessari (Utagawa *et al.*, Agric.Biol.Chem. 49, 3239-3246, 1985) o cellule intere coltivate in presenza di induttori della produzione degli enzimi stessi (Doskocil *et al.*, Collect. Czech. Chem. Commun. 42, 370-383, 1977).

Per le reazioni di biocatalisi condotte a livello preparativo, l'uso di cellule intere è generalmente preferibile rispetto all'uso degli enzimi isolati, in quanto permette sia di evitare l'estrazione e la purificazione degli enzimi che di recuperare facilmente le cellule al termine della reazione, per esempio per centrifugazione o per ultrafiltrazione, e di riutilizzarle per più cicli di reazione successivi. Sia UdP che PNP sono infatti enzimi caratterizzati da una buona stabilità termica che permette di condurre le reazioni di transglicosilazione a temperature fino a circa 60°C senza significative perdite di attività e di riutilizzare le preparazioni enzimatiche recuperate. Sono stati descritti anche approcci in cui il riciclo delle cellule usate come catalizzatori veniva realizzato mediante microincapsulazione in gel sia idrofilici (Votruba *et al.*, Collect.Czech.Chem. Commun. 59, 2303-2330, 1994) che idrofobici (Yokozeki *et al.*, Eur.J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 225-231, 1982).

I limiti principali dei metodi finora noti per preparare nucleosidi naturali ed analoghi modificati mediante reazioni di transglicosilazione con l'impiego di cellule batteriche risiedono nella bassa concentrazione enzimatica





ottenibile anche dopo induzione e nella impossibilità di utilizzare quantità ottimizzate delle due attività enzimatiche necessarie per catalizzare il trasferimento dello zucchero da un nucleoside donatore ad una base accettatrice.

5 Infatti, sia nel caso di selezione di ceppi batterici nativi ("wild-type") che nel caso di coltivazione dei ceppi in condizioni di induzione, si ottengono cellule contenenti livelli di UdP e PNP generalmente non superiori a 50 volte i livelli basali ed in rapporti non predeterminabili. Inoltre, poichè uno dei due enzimi (generalmente PNP) è presente nelle cellule indotte in 10 quantità inferiori, è solitamente necessario utilizzare un eccesso di cellule tale da garantire la presenza dell'enzima limitante a livelli compatibili con una accettabile cinetica complessiva della reazione di interconversione. Da un punto di vista operativo questo comporta che una porzione significativa della miscela di reazione risulta costituita dalla sospensione cellulare, con la 15 conseguente limitazione del volume utilizzabile per la solubilizzazione dei substrati e, in definitiva, con una minore resa volumetrica di prodotto finale.

L'oggetto della presente invenzione è pertanto rappresentato dalla costruzione di ceppi batterici geneticamente modificati in grado di 20 risolvere i problemi sopra descritti e, in particolare, di catalizzare reazioni di transglycosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettatrice con rese elevate, prevedibili e soprattutto riproducibili su scala industriale e con cinetiche enzimatiche particolarmente rapide.

In letteratura sono stati descritti il clonaggio e l'espressione di alcune 25 fosforilasi ricombinanti, quali per esempio UdP umana (Watanabe e



Uchida, Biochem.Biophys.Res.Commun. 216, 265-272, 1996), murina (Watanabe *et al.*, J.Biol.Chem. 270, 12191-12196, 1995), di *Escherichia coli* (Mikhailov *et al.*, Biochem. Internat. 26, 607-615, 1992) e PNP umana (Erion *et al.*, Biochemistry 36, 11725-11734, 1997), del microrganismo

5 termofilo *Bacillus stearothermophilus* (Hamamoto *et al.*, Biosci.Biotech.Biochem. 61, 272-275, 1997; Hamamoto *et al.*, Biosci.Biotech.Biochem. 61, 276-280, 1997) oltre ad UdP e PNP da *Klebsiella* sp (Takehara *et al.*, Biosci.Biotech.Biochem. 59, 1987-1990, 1995).

10 Sono stati ora trovati e costituiscono uno degli oggetti della presente invenzione nuovi ceppi batterici geneticamente modificati contenenti i geni codificanti per polipeptidi aventi l'attività enzimatica degli enzimi UdP e PNP, sia separatamente che congiuntamente. La coltivazione di questi nuovi ceppi consente infatti di ottenere sia elevati livelli di biomassa che di 15 espressione degli enzimi ricombinanti; i nuovi ceppi secondo la presente invenzione possono essere inoltre utilizzati direttamente quali catalizzatori per la produzione di nucleosidi naturali e di analoghi modificati con rese sostanzialmente superiori rispetto a quanto consentito dalla tecnica nota.

Come ospiti per l'espressione degli enzimi ricombinanti secondo la 20 presente invenzione sono preferibilmente utilizzabili cellule batteriche di *Escherichia coli*; particolarmente interessanti sono i ceppi K12 (preferibilmente DH5 α o MG1655) e/o i ceppi B; alternativamente possono essere comunque utilizzate cellule di altri microrganismi procarioti che siano accettabili per l'impiego industriale in quanto non

01

pericolosi per gli operatori e per l'ambiente e possano essere coltivati facilmente per ottenere livelli elevati di biomassa.

Secondo una delle realizzazioni della presente invenzione, le cellule batteriche di *Escherichia coli* sono state trasformate con vettori plasmidici

5 di espressione ricombinanti in cui sono stati clonati sia separatamente che contemporaneamente i geni *udp* e *deoD* di *E.coli*. Le sequenze geniche codificanti geni *udp* e *deoD* preferibilmente utilizzabili per gli scopi della 10 presente invenzione sono depositate in banca dati EMBL con numero di accesso X15689 (*udp*) ed M60917 (*deoD*); possono tuttavia essere utilizzate anche altre sequenze comunemente disponibili, come per esempio 15 AC CG01747 (*udp*) e AC CG00327 (*deoD*).

I vettori plasmidici di espressione utilizzabili per gli scopi dell'invenzione e che costituiscono uno degli oggetti della stessa sono caratterizzati da comprendere:

- 15 a) almeno una sequenza genica codificante per un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP; e,
- b) almeno una sequenza genica codificante per la resistenza ad un antibiotico.

Detta almeno una sequenza codificante per la resistenza ad un antibiotico è 20 preferibilmente una sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina e/o per la resistenza all'ampicillina; nella realizzzazione preferita dell'invenzione, entrambe le sequenze sono presenti sul vettore plasmidico.

Come risulterà evidente dagli esempi, i vettori plasmidici della presente 25 invenzione sono ottenibili clonando sia la sequenza codificante per *udp* e/o la sequenza codificante per *deoD* che, eventualmente, la sequenza

codificante per la resistenza alla tetraciclina sul plasmide pUC18 (Yanish e Perron, Gene 33, 103-119, 1985; numero di accesso EMBL L08752) che già contiene il gene per la resistenza all'ampicillina; la posizione relativa delle sequenze codificanti per *udp* e *deoD* non è comunque rilevante ai fini

5 dell'invenzione. La sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina è preferibilmente il gene Tc di pBR322.

In particolare, la sequenza codificante per *udp* e/o la sequenza codificante per *deoD* sono inseriti sul plasmide in corretta fase di lettura rispetto al promotore batterico *lac*, già presente sul plasmide. Tuttavia, come si vedrà 10 dagli esempi che seguono, la presenza di un promotore e in particolare del promotore *lac* non è un elemento essenziale per gli scopi della presente invenzione; la crescita cellulare e l'espressione dei polipeptidi è risultata infatti essere indipendente dalla presenza di un induttore (IPTG).

In questo modo, secondo metodiche ben note e che risulteranno evidenti 15 dagli esempi, sono stati costruiti i seguenti plasmidi, raffigurati in figura 1:

- pGM679: gene *udp* clonato sul plasmide pUC18 (SEQ ID NO 1). Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM679 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 a 1021: sequenza del gene *udp* di *E. coli*; da 20 1022 a 3444: sequenza di pUC18.
- pGM708: gene *udp* clonato sul plasmide pUC18 insieme al gene per la resistenza alla tetraciclina (SEQ ID NO 2). Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM708 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 25 a 1021: sequenza del gene *udp* di *E. coli*; da 1022 a 1039: sequenza di





pUC18; da 1040 a 1482: sequenza di pHp45Ω da 1483 a 2883: sequenza del gene Tc di pBR322; da 2884 a 3151: sequenza di pHp45Ω; da 3152 a 5556: sequenza di pUC18.

- pGM678: gene *deoD* clonato sul plasmide pUC18 (SEQ ID NO 3).

5 Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM678 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 230: sequenza di pUC18; da 231 a 960: sequenza del gene *deoD* di *E. coli*; da 961 a 3383: sequenza di pUC18.

- pGM707: gene *deoD* clonato sul plasmide pUC18 insieme al gene per

10 la resistenza alla tetraciclina (SEQ ID NO 4). Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM707 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 230: sequenza di pUC18; da 231 a 960: sequenza del gene *deoD* di *E. coli*; da 961 a 978: sequenza di pUC18; da 979 a 1422: sequenza di pHp45Ω da 1423 a 2822: sequenza 15 del gene Tc di pBR322; da 2823 a 3090: sequenza di pHp45Ω da 3091 a 5495: sequenza di pUC18.

- pGM712: geni *udp* e *deoD* clonati sul plasmide pUC18 (SEQ ID NO 5).

Nella numerazione della sequenza la coordinata 1 di pGM712 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 a 1021: sequenza del gene *udp* di *E. coli*; da 20 1022 a 1025: sequenza di pUC18; da 1026 a 1036: sequenza di pBAD24; da 1037 a 1766: sequenza del gene *deoD* di *E. coli*; da 1767 a 1792: sequenza di pBAD24; da 1793 a 4189: sequenza di pUC18.

- pGM716: geni *udp* e *deoD* clonati sul plasmide pUC18 insieme al gene

25 per la resistenza alla tetraciclina (SEQ ID NO 6). Nella numerazione



- della sequenza la coordinata 1 di pGM716 coincide con quella della sequenza del vettore pUC18; dal nucleotide 1 al 242: sequenza di pUC18; da 243 a 1021: sequenza del gene udp di *E. coli*; da 1022 a 1025: sequenza di pUC18; da 1026 a 1036: sequenza di pBAD24; da 5 1037 a 1766: sequenza del gene deoD di *E. coli*; da 1767 a 1792: sequenza di pBAD24, da 1793 a 1794: sequenza di pUC18, da 1795 a 2228 sequenza di pHp45Ω da 2229 a 3628: sequenza del gene Tc di pBR322; da 3629 a 3896: sequenza di pHp45Ω; da 38971 a 6301: sequenza di pUC18.
- 10 I ceppi ricombinanti così ottenuti esprimono i polipeptidi aventi l'attività degli enzimi UdP e PNP in elevate quantità, minimizzando eventuali problemi di compatibilità e/o solubilità derivabili dalla presenza di proteine eterologhe.
- In particolare sono stati costruiti i ceppi batterici denominati 15 DH5α/pGM678, MG1655/pGM678, DH5α/pGM707 e MG1655/pGM707 che sovraesprimono l'enzima PNP, i ceppi DH5α/pGM679, MG1655/pGM679, DH5α/pGM708 e MG1655/pGM708 che sovraesprimono l'enzima UdP, ed i ceppi DH5α/pGM712, DH5α/pGM716 e MG1655/pGM716 che sovraesprimono 20 contemporaneamente gli enzimi PNP ed UdP. L'efficienza di questi nuovi ceppi, sia come produttori degli enzimi PNP ed UdP che come biocatalizzatori per la preparazione di nucleosidi mediante reazioni di bioconversione, è stata confrontata con una preparazione di cellule di *Enterobacter aerogenes* coltivate in presenza di induttori in quanto questo 25 microrganismo, secondo i dati di letteratura disponibili, è stato finora

considerato uno dei migliori per la capacità di catalizzare le reazioni di transglicosilazione (Utagawa *et al.*, Agric.Biol.Chem. 49, 1053-1058, 1985; Utagawa *et al.*, Agric.Biol.Chem. 49, 2711-2717, 1985). L'uso dei nuovi ceppi ricombinanti nella produzione di polipeptidi aventi l'attività 5 dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP e/o quali catalizzatori di reazioni di transglicosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accetrice costituisce uno degli ulteriori oggetti della presente invenzione.

L'attività enzimatica dei ceppi ricombinanti è stata determinata incubando direttamente la sospensione cellulare in tampone fosfato con un nucleoside 10 pirimidinico (per esempio uridina) per saggiare l'attività di UdP o con un nucleoside purinico (per esempio inosina) per saggiare l'attività di PNP e determinando la formazione rispettivamente della base pirimidinica (uracile) o purinica (ipoxantina) formatasi per cromatografia liquida ad alta pressione su fase inversa (RP-HPLC).

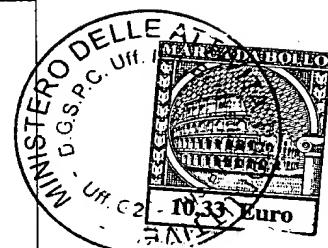
15 Applicando questo saggio sono stati misurati nei ceppi batterici ricombinanti oggetto della presente invenzione e nel ceppo di *E.aerogenes* di confronto le attività enzimatiche di UdP e PNP ottenendo i risultati riportati nella tabella 1, in cui si evidenzia come i ceppi ricombinanti hanno attività enzimatiche fino a circa 30-100 volte superiori rispetto al ceppo di 20 confronto coltivato in condizioni di induzione.

CJ

Tabella 1

Comparazione delle attività enzimatiche di uridina fosforilasi (UdP) e purina nucleoside fosforilasi (PNP) nei ceppi di *E.coli* ricombinanti e nel ceppo di *E.aerogenes* di confronto.

Nuovi ceppi batterici secondo l'invenzione	Attività UdP unità/gr di cellule	Attività PNP unità/gr di cellule
MG1655 "wild-type"	4,5 ± 0,2	3,5 ± 0,2
MG1655/pGM707	7,5 ± 0,1	2400,0 ± 50,0
MG1655/pGM708	1550,0 ± 60,0	6,5 ± 0,5
MG1655/pGM716	5400,0 ± 450,0	850,0 ± 30,0
Ceppo di confronto		
<i>E.aerogenes</i> ATCC	3,7 ± 0,2	3,0 ± 0,2
13048 non indotto		
<i>E.aerogenes</i> ATCC	168,3 ± 2,9	19,0 ± 2,2
13048 indotto		



Le cellule intere dei ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione

possono essere convenientemente utilizzate come biocatalizzatori per la preparazione di nucleosidi naturali e di analoghi modificati a partire da un nucleoside donatore di zucchero e da una base accetrice mediante reazioni

- 5 di bioconversione che richiedono la presenza di un solo tipo di fosforilasi (UdP o PNP) o la presenza contemporanea di UdP e PNP secondo i seguenti schemi generali:



- a) nucleoside-pirimidinicoP1 + base-pirimidinicaP2 → nucleoside-pirimidinicoP2 + base- pirimidinicaP1, in presenza di cellule ricombinanti che sovraesprimono UdP;
- 5 b) nucleoside-purinicoP1 + base-purinicaP2 → nucleoside-purinicoP2 + base purinicaP1, in presenza di cellule ricombinanti che sovraesprimono PNP;
- c) nucleoside-pirimidinico + base-purinica → nucleoside-purinico + base-pirimidinica, in presenza di una miscela di cellule ricombinanti che sovraesprimono separatamente UdP e PNP o di cellule di un singolo ceppo
- 10 ricombinante che co-esprime UdP e PNP;
- d) nucleoside-purinico + base-pirimidinica → nucleoside-pirimidinico + base-pirimidinica, in presenza di una miscela di cellule ricombinanti che sovraesprimono separatamente UdP e PNP o di cellule di un singolo ceppo ricombinante che co-esprime UdP e PNP.
- 15 Si è inoltre notato che i plasmidi pGM678, pGM679 e pGM712, che contengono il solo gene per la resistenza all'ampicillina presentano una certa tendenza a polimerizzare in ceppi che portano la mutazione RecA⁻, quale per esempio il ceppo MG1655. Al contrario, i plasmidi pGM707, pGM708 e pGM716 che contengono sia il gene per la resistenza alla
- 20 tetraciclina che quello per la resistenza all'ampicillina sono invece particolarmente stabili in cellule di questo tipo, sia in condizioni di crescita che in fase di espressione.

Secondo le informazioni riportate in letteratura, nelle reazioni di bioconversione catalizzate da UdP e PNP, come nucleosidi donatori si devono considerare sia i nucleosidi naturali o modificati contenenti D-



- ribosio e 2'-deossiribosio che nucleosidi contenenti il gruppo ribosilico modificato nelle posizioni 2', 3' e 5' ed in particolare nucleosidi nei quali lo zucchero sia costituito da β -D-arabinosio, α -L-xilosio, 3'-deossiribosio, 3'-5'-deossiribosio, 2'-3'-dideossiribosio, 5'-deossiribosio, 2'-5'-
5 dideossiribosio, 2'-ammino-2'-deossiribosio, 3'-ammino-3'-deossiribosio, 2'-fluoro-2'-deossiribosio. Le basi accettrici che possono essere usate nelle reazioni di bioconversione catalizzate da UdP e PNP sono le basi pirimidiniche e puriniche naturali o sostituite, in particolare le basi puriniche sostituite nelle posizioni 1, 2 e 6, le basi pirimidiniche sostituite
10 in posizione 3 e 5 oltre ad altri sistemi eterociclici contenenti uno o più atomo di azoto quali per esempio purina, 2-azapurina, 8-azapurina ed analoghi sostituiti, 1-deazapurina (imidazopiridina), 3-deazapurina, 7-deazapurina ed analoghi sostituiti, triazolo ed analoghi sostituiti, pirazolo ed analoghi sostituiti, composti imidazolici ed analoghi sostituiti.
15 Un'altra modalità di preparazione dei nucleosidi naturali e modificati resa possibile dalla presente invenzione è l'impiego delle cellule ricombinanti per catalizzare la reazione di fosforolisi di un nucleoside donatore (impiegando UdP o PNP secondo la base presente nel nucleoside donatore) ed ottenere l' α -zucchero-1-fosfato che può essere eventualmente isolato
20 mediante tecniche di cromatografia, di estrazione o di precipitazione ed essere utilizzato nella successiva reazione di trasferimento dello zucchero su una appropriata base accetrice in presenza di UdP o PNP (in dipendenza della natura della base accetrice).
La disponibilità di ceppi batterici ricombinanti che sovraesprimono
25 separatamente gli enzimi UdP e PNP permette inoltre di stabilire le



condizioni delle reazioni di transglicosilazione in termini di attività ottimale
di ciascuno dei due enzimi attraverso prove preliminari in cui la reazione
viene condotta in presenza di miscele contenenti proporzioni variabili di
cellule di ciascuno dei due ceppi. Per ogni reazione di transglicosilazione è
5 perciò possibile definire su scala analitica i rapporti ottimali di attività
enzimatica di UdP e di PNP mentre nel successivo scale-up preparativo
possono essere impiegati sia la miscela di cellule dei due ceppi che
esprimono UdP e PNP singolarmente, sia il solo ceppo che co-esprime UdP
e PNP qualora i loro rapporti siano già ottimali, sia eventualmente il ceppo
10 che co-esprime UdP e PNP integrato con cellule dei ceppi esperimenti UdP o
PNP.

Come esempio di ottimizzazione delle reazioni di bioconversione nella
presente invenzione sono descritte dettagliatamente le procedure relative
alla preparazione di 9- β -D-arabinofuranosiladenina (Ara-A) e di 1- β -D-
15 ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carbossammide (ribavirina) che indicavano
che i migliori risultati si ottenevano con rapporti di attività UdP:PNP
rispettivamente di 2 : 1 e di 1 : 1 e con una concentrazione di 10 unità/ml di
UdP e di 5 unità/ml di PNP per Ara-A e di 10 unità/ml sia di UdP che di
PNP per ribavirina. Questi parametri, che sono facilmente implementabili
20 utilizzando i ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione,
permettevano di ottimizzare la concentrazione di cellule da usare come
biocatalizzatori ottenendo, nel contempo, la massima resa di
bioconversione compatibile con le costanti di equilibrio delle reazioni
enzimatiche e la riduzione dei tempi di reazione. Analogamente possono

essere ottimizzate tutte le reazioni di transglicosilazione per la preparazione di nucleosidi ed analoghi modificati.

I nuovi ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione permettono di preparare nucleosidi naturali e nucleosidi modificati con risultati 5 significativamente migliori rispetto alle tecnologie enzimatiche finora note che sono basate sull'uso di enzimi isolati o sull'uso di cellule batteriche di ceppi di microrganismi wild-type e di ceppi di microrganismi coltivati in condizioni di induzione delle attività degli enzimi fosforilasici.

Il confronto di diverse reazioni di transglicosilazione condotte utilizzando 10 rapporti costanti tra concentrazione di nucleoside donatore (60 mM) e base accettrice (20 mM) ed in cui è stato calcolato un parametro di produttività (Simon *et al.*, Angew.Chem 24, 539-553, 1985) che tiene in considerazione oltre che l'attività specifica anche fattori operativi quali per esempio i fenomeni di trasporto intra- ed extra-cellulari e la concentrazione 15 volumetrica dei prodotti finali indica che l'uso dei ceppi ricombinati oggetto della presente invenzione è costantemente caratterizzato da una maggiore efficienza di bioconversione e da una più elevata produttività per unità di tempo e di volume rispetto all'uso di microrganismi convenzionali (tabella 2).

20 **Tabella 2. Confronto dell'efficienza delle reazioni di transglicosilazione catalizzate da cellule ricombinanti di *Escherichia coli* (E) e da cellule di *Entereobacter aerogens* di controllo (C).**

Le reazioni sono state condotte a 60°C per il tempo indicato utilizzando le stesse concentrazioni di nucleoside donatore (60 mM) e di base accettrice 25 (20 mM). La resa di bioconversione è stata calcolata rispetto alla base



accettrice mediante analisi RP-HPLC della miscela di reazione. L'efficienza della reazione è espressa dall'indice di produttività P, calcolato dalla seguente formula $P = n \cdot m^{-1} \cdot t^{-1} \cdot 1000$ dove n = concentrazione del prodotto finale (g/l); m = pasta cellulare umida (g/l di miscela di reazione) e t = tempo di reazione in ore.

5

Prodotto	Nucleoside	Base	Pasta cellulare		t		Bioconversione		P	
			60 mM	20 mM	g/100 ml		ore		%	
			C	E	C	E	C	E	C	E
Ribavirina	Uridina	1,2,4-triazol 3-carbossi anamide	5	0,1	25	6	85	92	3	750
2'-deossi guanosina	2'-deossi uridina	Guanina	5	0,5	4	2	80	86	25	550
2'-deossi adenosina	2'-deossi uridina	Adenina	1	0,05	2	1	95	95	240	9600
Timidina	2'-deossi uridina	Timina	0,5	0,05	1	3	59	60	600	2000
2'-deossi ribofuranosil 2,6-diammino purina	2'-deossi uridina	2,6-diammino purina	2	0,05	2	1,5	89	91	125	6660
Ara-A	Ara-U	Adenina	5	0,5	20	2	85	87	5	480

In particolare, come si evidenzia nell'esempio riportato nella tabella 3 riguardante la preparazione di Ara-A a partire da Ara-U ed adenina, l'impiego dei ceppi ricombinanti permette di migliorare sia dal punto di

vista tecnico che economico i processi di bioconversione tradizionali e di ottenere rese di bioconversione più elevate, tempi di reazione inferiori, più elevata resa volumetrica dei prodotti finali con l'impiego di una minore concentrazione di cellule.

5 **Tabella 3. Confronto delle condizioni operative per la preparazione di Ara-A mediante transglicosilazione catalizzata da cellule ricombinanti di *E.coli* e da una preparazione di *E.aerogenes* di confronto.**

Condizioni operative	Cellule <i>E.coli</i> ricombinanti	Cellule <i>E.aerogenes</i>
Ceppo	MG1655/pGM716	<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048 indotto
Rapporto Ara-U : Adenina	75 : 75 (mM)	40 : 40 (mM)
Concentrazione ceiiuie	0,5%	5%
Tempo di reazione	4 ore	20 ore
Resa di bioconversione	70%	55%
Resa volumetrica	13 g Ara-A/litro	5 g Ara-A/litro

Un ulteriore vantaggio derivante dall'impiego dei ceppi ricombinanti è costituito dalla semplificazione dei processi di recupero e riutilizzo della biomassa cellulare derivati dalla presenza di una minore concentrazione di cellule; così per esempio l'eventuale recupero delle cellule per filtrazione od ultrafiltrazione ed il loro successivo riciclo, risulta notevolmente più rapido nel caso dell'impiego dei ceppi ricombinanti descritti nella presente invenzione. In alcuni casi, in particolare quando si impiegano substrati con elevata affinità per gli enzimi, la concentrazione di cellule ricombinanti necessaria si riduce a valori così bassi che può risultare economicamente



conveniente evitare il recupero delle cellule con una ulteriore semplificazione del processo produttivo.

Gli esempi di seguito riportati hanno lo scopo di illustrare la presente invenzione senza che costituiscano una limitazione del suo campo di
5 applicazione.

Esempio N°1

Clonaggio del gene *udp* di *Escherichia coli* in un vettore di espressione.

La sequenza del gene *udp* di *E. coli* è stata reperita nella banca dati EMBL con il numero di accesso X15689.

10 Il gene è stato amplificato per PCR con gli oligonucleotidi 5'-ATCGGTACCATCCATGTCCAAGTCTGATGTTTCATCTC-3' e 5'
-AGACGGTCGACAAGAGAATTACAGCAGACGACGC-3' dal ceppo di
E. coli K12 MG1655 (Singer *et al.*, Microbiol. Rev. 53, 1-24, 1989). La
regione amplificata comprende l'intera sequenza del gene *udp* a partire dal
15 codone d'inizio ATG fino a 7 bp a valle del codone di stop TAA. Al 5' del
gene è stato inserito un sito di restrizione *Kpn*I, seguito da quattro basi
scelte a caso, al 3' del gene è presente un sito *Sal*I. Il frammento
amplificato, digerito con *Kpn*I e *Sal*I, è stato clonato nella regione
polylinker del vettore pUC18, che porta il gene per la resistenza ad
20 ampicillina (Yanish e Perron, Gene 33, 103-119, 1985; numero di accesso
EMBL L08752). Dopo trasformazione del ceppo DH5 α (Hanahan, J. Mol.
Biol. 166, 557-580, 1983) è stato ottenuto il plasmide pGM679 (figura 1).
Nel costrutto si crea una fusione tra i primi codoni del gene *lacZ* di pUC18
e l'intera sequenza di *udp* (figura 2) e la trascrizione è sotto il controllo del
25 promotore *lac* del vettore.

91

La regione clonata è stata interamente sequenziata ed è stata riscontrata la perfetta identità con la sequenza in banca dati. La sequenza del plasmide pGM679 è riportata in figura 3.

Nel plasmide pGM679 è stato successivamente inserito il gene Tc di
5 pBR322, che conferisce resistenza alla tetraciclina (Bolivar *et al.*, Gene 2, 95-113, 1977; numero di accesso EMBL J01749). Il gene, preceduto dal suo promotore, è stato ottenuto per digestione *Hind*III dall'interposone pH_P45Ω708-Tc (Fellay *et al.*, Gene 52, 147-154, 1987) e clonato nel sito *Hind*III di pGM679. Il plasmide risultante è stato denominato pGM708
10 (figura 1). La sua sequenza completa è riportata in figura 3.

Esempio N°2

Clonaggio del gene *deoD* di *Escherichia coli* in un vettore di espressione.

La sequenza del gene *deoD* di *E. coli* è stata reperita nella banca dati EMBL con il numero di accesso M60917.

15 Il gene è stato amplificato per PCR con gli oligonucleotidi 5'-CTGAATTCTTCCATGGCTACCCCCACACATTAATGCAG-3' e 5'-TC ATGGTCGACTTACTCTTATCGCCCAGCAGAACG-3' dal ceppo di *E. coli* K12 MG1655 (Singer *et al.*, Microbiol. Rev. 53, 1-24, 1989). La regione amplificata comprende l'intera sequenza del gene *deoD* a partire dal 20 codone d'inizio ATG fino al codone di stop TAA. Al 5' del gene è stato inserito un sito di restrizione *Eco*RI, seguito da quattro basi scelte a caso, al 3' del gene è presente un sito *Sal*I. Il frammento amplificato, digerito con *Eco*RI e *Sal*I, è stato clonato nella regione polylinker del vettore pUC18, che porta il gene per l'ampicillina resistenza (Yanish e Perron, Gene 33, 103-119, 1985; numero di accesso EMBL L08752). Dopo trasformazione





del ceppo DH5 α (Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983) è stato ottenuto il plasmide pGM678 (figura 1). Nel costrutto si crea una fusione tra i primi codoni del gene *lacZ* di pUC18 e l'intera sequenza di *deoD* (figura 2) e la trascrizione è sotto il controllo del promotore *lac* del vettore.

- 5 La regione clonata è stata interamente sequenziata ed è stata riscontrata la perfetta identità con la sequenza in banca dati. La sequenza del plasmide pGM678 è riportata in figura 3.

Nel plasmide pGM678 è stato successivamente inserito il gene Tc, che conferisce resistenza alla tetraciclina, in modo analogo a quanto descritto
10 nell'esempio N° 1. Il plasmide risultante è stato denominato pGM707 (figura 1). La sua sequenza completa è riportata in figura 3.

Esempio N°3

Clonaggio dei geni *udp* e *deoD* in un unico vettore d'espressione.

I geni *udp* e *deoD* sono stati clonati nello stesso vettore allo scopo di
15 esprimere contemporaneamente gli enzimi UdP e PNP all'interno della stessa cellula. Ciò è stato ottenuto inserendo il gene *deoD* nel plasmide pGM679, a valle di *udp*. Per la costruzione, il frammento *EcoRI-SalI* di pGM678, contenente il gene *deoD*, è stato clonato nel vettore pBAD24 (Guzman et al., J. Bacteriol. 177, 4121-4230, 1995; numero di accesso
20 EMBL X81838). Il frammento *NheI* (con le estremità riempite) - *SphI* di questo costrutto è stato clonato in pGM679, digerito *SalI* (riempito)-*SphI*, ottenendo pGM712 (Figura 1). In pGM712 entrambi i geni *udp* e *deoD* sono trascritti a partire dal promotore *lac*, ma la traduzione di *deoD* è indipendente da quella di *udp*, in quanto a monte di *deoD* è presente una
25 sequenza per l'attacco dei ribosomi (figura 2). Va notato che la proteina

PNP espressa da pGM712 è identica a quella selvatica, in quanto è stata eliminata la fusione con i primi codoni di *lacZ* al 5' del gene (figura 2). La sequenza completa di pGM712 è riportata in figura 3.

Nel plasmide pGM712 è stato successivamente inserito il gene Tc, che

- 5 conferisce resistenza alla tetraciclina, come descritto nell'esempio N° 1. Il plasmide risultante è stato denominato pGM716 (figura 1). La sua sequenza completa è riportata in figura 3.

Esempio N°4.

Trasformazione di *E. coli*.

- 10 Il ceppo di *E.coli* K12 DH5 α , che porta la mutazione *recA1* (Hanahan, J.Mol.Biol. 166, 557-580, 1983), e il ceppo wild-type MG1655 (Singer *et al.*, Microbiol.Rev. 53, 1-24, 1989) sono stati trasformati con i plasmidi pGM678, pGM679, pGM707, pGM708, pGM712 e pGM716. Il genotipo dei ceppi e alcune caratteristiche dei ceppi ricombinanti sono riportate in 15 tabella 4 e 5. I trasformanti di pGM678, pGM679 e pGM712 sono stati selezionati su terreno contenente ampicillina (50 μ g/ml) e quelli di pGM707, pGM708 e pGM716 su terreno contenente tetraciclina (12,5 μ g/ml).

Tabella 4. Genotipo dei ceppi ospiti.

Ceppo	Genotipo	Referenza
<i>E.coli</i> K12 DH5 α	F $^+$, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r K^- , m K^+), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi</i> 1,	Hanahan, J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983

CM

	<i>gyrA96, relA1</i>	
<i>E.coli</i> K12 MG1655	LAM- <i>rph-1</i>	Singer <i>et al.</i> , Microbiol. Rev. 53, 1-24, 1989

Tabella 5. Caratteristiche dei nuovi ceppi ricombinanti.

Denominazione del ceppo	Espressione delle proteine clonate	Resistenza
DH5 α /pGM678	purina nucleoside fosforilasi	ampicillina
DH5 α /pGM679	uridina fosforilasi	ampicillina
DH5 α /pGM707	purina nucleoside fosforilasi	tetraciclina/ampicillina
DH5 α /pGM708	uridina fosforilasi	tetraciclina/ampicillina
DH5 α /pGM712	purina nucleoside fosforilasi e uridina fosforilasi	ampicillina
DH5 α /pGM716	purina nucleoside fosforilasi e uridina fosforilasi	tetraciclina/ampicillina
MG1655/pGM678	purina nucleoside fosforilasi	ampicillina
MG1655/pGM679	uridina fosforilasi	ampicillina
MG1655/pGM707	purina nucleoside fosforilasi	tetraciclina/ampicillina

Cm

MG1655/pGM708	uridina fosforilasi	tetraciclina/ampicillina
MG1655/pGM716	purina nucleoside fosforilasi e uridina fosforilasi	tetraciclina/ampicillina

La presenza del plasmide nei ceppi trasformati è stata confermata da estrazione del DNA plasmidico e analisi su gel di agarosio 0,6%.

La crescita dei ceppi trasformati in brodo LD (composizione per litro: 10 g

Bactotryptone (Difco), 5 g Yeast extract (Difco), 5 g NaCl) o in terreno

5 solido (LD + 10 g/l agar), addizionati di ampicillina (50 µg/ml) o tetraciclina (12,5 µg/ml, solo per i ceppi trasformati con pGM707, pGM708 e pGM716) è paragonabile a quella dei ceppi di controllo, trasformati con il vettore pUC18. Inoltre, i ceppi trasformati con i plasmidi pGM707, pGM708, pGM716, che portano la doppia resistenza, non mostrano

10 differenze di crescita in presenza di ampicillina e di tetraciclina.

Esempio N°5

Valutazione dell'espressione delle proteine UdP e PNP nei ceppi ricombinanti.

Precolture dei ceppi ricombinanti sono state ottenute inoculando cloni

15 singoli in terreno LD addizionato di antibiotico e incubando a 37°C statico per una notte. Le colture sono state diluite 1 : 20 in terreno LD + antibiotico in beuta e incubate a 37°C con agitazione fino al raggiungimento della fase stazionaria, corrispondente a valori di densità cellulare di circa 2 unità di densità ottica a 600 nm. Le proteine totali estratte da 1 ml di coltura sono

20 state separate su gel di poliacrilammide 15% in condizioni riducenti (SDS-





- PAGE) e le proteine sono state evidenziate per colorazione con Comassie. Le proteine PNP ed UdP sono state identificate in base al peso molecolare di circa 26,6 kDa per PNP e 28,2 kDa per UdP. Il risultato ottenuto dagli estratti dei ceppi MG1655/pGM707, pGM708 e pGM716 è riportato nella 5 figura 4. L'analisi elettroforetica dimostra che in tutti i campioni esaminati si ha sovraespressione di UdP e PNP in quanto le bande proteiche corrispondenti rappresentano una significativa percentuale delle proteine cellulari totali; questo risultato è confermato dalla determinazione quantitativa delle attività enzimatiche riportata nella tabella 1.
- 10 Poiché nei ceppi ricombinanti, i geni *deoD* ed *udp* sono clonati sotto il controllo del promotore *lac*, la crescita delle cellule e l'espressione delle proteine UdP e PNP sono state controllate sia in assenza che in presenza di 40 mg/l di IPTG come induuttore della trascrizione. I risultati ottenuti hanno indicato che la presenza di IPTG non modifica la crescita cellulare e non 15 aumenta il livello di espressione PNP ed UdP (ciò è dovuto all'insufficiente quantità di repressore in questi ceppi). Quest'ultimo risultato indica che nei ceppi ricombinanti oggetto della presente invenzione l'espressione dei geni *deoD* ed *udp* è costitutiva e raggiunge livelli molto elevati senza fenomeni di letalità o diminuita vitalità cellulare.
- 20 **Esempio N° 6.**

Determinazione dell'attività enzimatica e delle costanti cinetiche degli enzimi di uridina fosforilasi e purina nucleoside fosforilasi espressi intracellularmente in cellule batteriche ricombinanti.



La crescita dei ceppi è stata condotta come descritto nell'esempio N° 5. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione, pesate come pasta cellulare umida e conservate a -20°C fino al momento dei dosaggi enzimatici.

L'attività dell'enzima UdP è stata determinata in un saggio di fosforolisi

5 incubando per 5 min a 30°C una quantità nota di sospensione batterica in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenente 60 mM del substrato uridina.

La reazione enzimatica è stata bloccata acidificando con HCl 0,1N, le cellule sono state eliminate per filtrazione e la soluzione filtrata è stata analizzata per RP-HPLC su colonna C18 (Hypersyl 100; 4,6 x 250 mm)

10 eluendo in condizioni isocratiche con una fase mobile costituita da 0,02 M K₂HPO₄ in metanolo-H₂O (4 : 96 v/v) portata a pH 4,5 con NH₄OH. La quantità di uracile formatosi nella reazione veniva determinata in riferimento ad una curva standard e l'attività enzimatica della preparazione cellulare era calcolata in µmoli uracile/min/gr pasta cellulare umida

15 (unità/gr). L'attività dell'enzima PNP è stata determinata in un saggio di fosforolisi incubando per 10 min a 30°C una quantità nota di sospensione batterica in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenente 50 mM del substrato inosina. La reazione enzimatica è stata bloccata acidificando con HCl 0,1 N, le cellule sono state eliminate per filtrazione e la soluzione

20 filtrata è stata analizzata per RP-HPLC su colonna C18 (Hypersyl 100; 4,6 x 250 mm) eluendo in condizioni isocratiche con una fase mobile costituita da 0,02 M K₂HPO₄ in metanolo-H₂O (4 : 96 v/v) portata a pH 4,5 con NH₄OH. La quantità di ipoxantina formatasi nella reazione veniva determinata in riferimento ad una curva standard e l'attività enzimatica

della preparazione cellulare era calcolata in μ moli ipoxantina/ min/gr pasta cellulare umida (unità/gr).

Le costanti cinetiche dell'enzima UdP sono state determinate incubando in doppio aliquote di pasta cellulare ottenuta dalla fermentazione del ceppo

5 MG1655/pGM708 corrispondenti a 0,62 unità enzimatiche in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenenti concentrazioni crescenti dei seguenti substrati: uridina (da 1 mM a 60 mM); 2'-deossiuridina (da 1 mM a 60 mM) e β -D-arabinofuranosil-uracile o Ara-U (da 10 mM a 120 mM).

L'affinità per il fosfato (co-substrato della reazione di fosforolisi) è stata 10 determinata in un sistema di incubazione analogo contenente 60 mM uridina e concentrazioni di fosfato crescenti da 2 mM a 100 mM. La formazione di uracile è stata determinata per RP-HPLC come precedentemente descritto.

I parametri cinetici sono stati calcolati elaborando i risultati ottenuti sono 15 stati con il software Enzfitter secondo il metodo doppio reciproco di Lineweaver-Burk (J.Am.Chem.Soc. 56, 658, 1934) per ottenere i valori della costante apparente di affinità (Km) e della velocità massima (Vmax) riportati nella tabella 6.

**Tabella 6. Costanti cinetiche dell'enzima uridina fosforilasi
ricombinante espresso intracellularmente in un ceppo trasformato di**

E.coli

Substrato	Km mM	Vmax unità x min ⁻¹
Uridina	5,68 ± 0,13	0,77 ± 0,06

Ar

2'-deossiuridina	$2,64 \pm 0,10$	$0,42 \pm 0,01$
Ara-U	$18,30 \pm 2,44$	$0,35 \pm 0,01$
Fosfato	$14,7 \pm 2,30$	$0,36 \pm 0,02$

Le costanti cinetiche dell'enzima PNP sono state determinate incubando in doppio aliquote di pasta cellulare ottenuta dalla fermentazione del ceppo MG1655/pGM707) corrispondenti a 0,96 unità di attività enzimatica in tampone fosfato 100 mM-pH 7 contenenti concentrazioni crescenti del substrato inosina (da 1 mM a 60 mM); l'affinità per il fosfato (co-substrato della reazione di fosforilasi) è stata determinata in un sistema di incubazione analogo contenente 40 mM inosina e concentrazioni di fosfato da 0,5 mM a 100 mM. La formazione di ipoxantina è stata determinata per RP-HPLC come precedentemente descritto ed i risultati ottenuti sono stati elaborati con il software Enzfitter secondo il metodo doppio reciproco di Lineweaver-Burk per ottenere i valori della costante apparente di affinità (Km) e della velocità massima (Vmax) riportati nella tabella 7.

Tabella 7. Costanti cinetiche dell'enzima purina nucleoside fosforilasi ricombinante espresso intracellularmente in un ceppo trasformato di *E.coli*.

Substrato	Km mM	Vmax unità x min ⁻¹
Inosina	$1,78 \pm 0,17$	$0,24 \pm 0,01$
Fosfato	$6,40 \pm 0,50$	$0,43 \pm 0,01$

Esempio N° 7



Fermentazione dei ceppi ricombinanti

Preinoculo: un clone singolo dei ceppi MG1655/pGM707, pGM708 e pGM716 è stato inoculato in 10 ml LD con tetraciclina (12,5 µg/ml) e incubato per una notte a 37°C statico.

- 5 Un'aliquota di 1,5 ml della coltura è stata utilizzata per un'estrazione rapida
di DNA plasmidico (Holmes and Quickley, Anal. Biochem. 114, 193-197,
1981) che successivamente è stato separato su gel di agarosio 0,6% per
verificare la presenza di plasmide in forma monomerica. L'estrazione di
DNA plasmidico e la verifica della presenza di forme monomeriche viene
10 effettuata, come controllo, sia nelle precolture che precedono la
fermentazione che su campioni di coltura prelevati alla fine della
fermentazione.

La coltura viene utilizzata per l'inoculo di 200 ml di terreno avente la
seguente composizione: 20 g/l di peptone, 10 g/l di estratto di lievito e 10
15 g/l di NaCl. La coltura ottenuta dopo una crescita a 28° C per 14 ore è stata
utilizzata per l'inoculo di un fermentatore da 10 l sterilizzato in autoclave e
caricato con 4 litri di terreno avente la seguente composizione: 20 g/l di
Peptone (Difco); 36 g/l di estratto di lievito (Difco); 3,2 g/l di K₂HPO₄; 0,6
g/l di KH₂PO₄; 1 g/l di MgSO₄ e 0,5 g/l di antischiuma 1520 (Dow
20 Corning). Durante la fase produttiva la temperatura era mantenuta a 30°C e
l'ossigenazione era mantenuta da un flusso di 1 litro d'aria/litro di
brodocoltura/min. L'agitazione iniziale di 200 giri/min era modificata
automaticamente in relazione alla concentrazione dell'ossigeno dissolto in
modo da mantenere un livello di ossigeno dissolto pari al 30% della
25 concentrazione di saturazione. Durante la fermentazione il valore del pH

era mantenuto a 7 con aggiunte di H₂SO₄ diluito. La fermentazione era interrotta quando la crescita batterica, misurata come OD_{600nm}, si stabilizzava su un valore massimo (circa 35-40 OD_{600nm}). La massa cellulare era raccolta per centrifugazione, sospesa ed agitata brevemente in
5 tampone fosfato 30 mM-pH 7 e ricentrifugata. La pasta cellulare ottenuta (circa 50-70 grammi di pasta cellulare umida per litro di brodocoltura) era mantenuta a -20°C fino al momento dell'utilizzazione.

Esempio N° 8

Reazioni di tranglicosilazione su scala di laboratorio e calcolo dell'indice di
10 produttività.

Le reazioni di transglicosilazione sono state condotte utilizzando diversi nucleosidi donatori di zucchero alla concentrazione di 60 mM (uridina, 2'-deossiuridina, Ara-U) e diverse basi accettrici alla concentrazione di 20 mM (1-2-4-triazol-3-carbossammide, guanina, adenina, timina, 2,6
15 diammino-purina) a pH 7 in tampone fosfato (30 mM) in presenza di diverse concentrazioni di pasta cellulare derivate sia da colture del microrganismo di controllo *E.aerogenes* che da colture del ceppo di *E.coli* ricombinante MG1655/pGM716 che sovraesprime gli enzimi UdP e PNP.

Le reazioni sono state condotte a 60°C per diversi periodi di tempo (da 1
20 ora a 25 ore) e la percentuale di bioconversione, rispetto alla concentrazione iniziale di base accettrice, era determinata mediante analisi RP-HPLC della miscela di reazione diluita. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 2.

Per ogni reazione è stato calcolato l' indice di produttività P, applicando la
25 seguente formula:

$$P = n \cdot m^{-1} \cdot t^{-1} \cdot 1000$$

dove n = concentrazione del prodotto finale (g/l)

m = pasta cellulare umida (g/l miscela di reazione)

t = tempo di reazione in ore

- 5 L'indice di produttività rappresenta una misura complessiva dell'efficienza della reazione in quanto tiene conto sia delle caratteristiche proprie dell'interazione enzima-substrato che di parametri operativi quali il tempo di reazione, la quantità di cellule impiegate e la resa volumetrica di prodotto finale.
- 10 **Esempio N°9**

Ottimizzazione dell'impiego di cellule di *E.coli* ricombinante nelle reazioni di transglycosilazione.

- Le preparazione di ribavirina a partire da uridina (60 mM) e 1,2,4-triazol-3-carbossammide (40 mm) e di Ara-A a partire da Ara-U (40 mM) ed adenina (40 mM) sono state studiate come esempi di ottimizzazione dell'impiego di cellule ricombinanti di *E.coli* nelle reazioni di bioconversione. In ogni caso le reazioni erano condotte a 60°C in presenza di 30 mM di potassio fosfato a pH 7 e di quantità diverse di pasta cellulare ottenuta dalla fermentazione dei ceppi MG1655/pGM707 (sovraesperimenti l'enzima UdP) ed MG1655/pGM708 (sovraesperimenti l'enzima PNP). Ad intervalli prestabiliti, aliquote della miscela di reazione erano prelevate ed analizzate per RP-HPLC per determinare la percentuale di bioconversione (calcolata rispetto alla concentrazione di base accettrice).
- Lo studio è stato inizialmente condotto incubando per 20 ore la miscela di reazione in presenza di una concentrazione limitante di pasta cellulare (con

Cu

attività enzimatica totale uguale o inferiore a 2 unità/ml) ed operando in modo da avere rapporti di unità enzimatiche di UdP ed unità enzimatiche di PNP variabili nelle seguenti proporzioni 5:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:5.

I risultati ottenuti nelle due reazioni di bioconversione sono riportati nella
5 tabella 8.

Tabella 8. Studio delle condizioni delle reazioni di transglicosilazione.

1° fase

Le reazioni sono state condotte in presenza di concentrazioni limitanti di pasta cellulare per 20 ore a 60°C.

Preparazione di ribavirina			Preparazione di Ara-A		
UdP	PNP	Resa di bioconversione	UdP	PNP	Resa di bioconversione
unità/ml		%	unità/ml		%
1	0,2	60,7	1	0,2	54,0
1	0,5	77,3	1	0,5	65,2
1	1	81,6	1	1	63,8
0,5	1	80,0	0,5	1	26,4
0,2	1	78,1	0,2	1	9,2

- 10 I risultati riportati nella tabella dimostrano che i rapporti ottimali di attività UdP e PNP sono di 1 : 1 e di 1 : 0,5 rispettivamente per la reazione di formazione di ribavirina e di Ara-A.



Questi dati sono stati confermati nello studio successivo in cui sono state utilizzate concentrazioni di enzima 10 volte superiori mantenendo le stesse proporzioni tra unità di UdP ed unità di PNP; in questo studio inoltre è stata determinata la cinetica di reazione prelevando campioni di miscela di reazione ad intervalli di 1 ora per l'analisi RP-HPLC e ed il calcolo della percentuale di bioconversione.

Nelle tabelle 9 e 10 sono riportati, rispettivamente per la reazione di preparazione di ribavirina e di Ara-A, i parametri ottimali in termini di percentuale di bioconversione e di tempo di reazione per le diverse proporzioni di UdP e PNP studiate.

Tabella 9. Ottimizzazione delle condizioni di reazione per la preparazione di ribavirina.

UdP unità/ml	PNP unità/ml	Tempo di reazione ore	Bioconversione %
10	2	20	89,4
10	5	4	89,5
10	10	2	91,2
5	10	2	91,2
2	10	2	91,1

Tabella 10. Ottimizzazione delle condizioni di reazione per la preparazione di Ara-A.

UdP unità/ml	PNP unità/ml	Tempo di reazione ore	Bioconversione %

10	2	3	70,5
10	5	2	70,8
10	10	2	70,6
5	10	6	70,1
2	10	6	70,0

I risultati dello studio di ottimizzazione indicano che ribavirina può essere ottenuta in 2 ore con una resa di bioconversione del 91 % utilizzando 10 unità/ml sia di UdP che di PNP mentre Ara-A può essere ottenuta in 2 ore con una resa di bioconversione di circa il 71% utilizzando 10 unità/ml di UdP e 5 unità/ml di PNP.

A partire dal titolo in attività enzimatica dei ceppi di *E.coli* ricombinanti descritti nella presente invenzione è quindi possibile calcolare la quantità di pasta cellulare necessaria per preparare ribavirina ed Ara A in condizioni ottimali. Nel caso, per esempio, dei ceppi MG1655/pGM707 e MG1655/pGM716 aventi le attività specifiche riportate nella tabella 1, verranno utilizzati 0,4 e 0,2 grammi di pasta cellulare umida/100 ml di reazione rispettivamente per la preparazione di ribavirina e di Ara-A.

Esempio N° 10

Preparazione su scala pilota di Ara-A per reazione di transglicosilazione condotta con il ceppo di confronto di *E.aerogenes* e con i ceppi ricombinanti di *E.coli*.

Il processo di preparazione di Ara-A per transglicosilazione catalizzata da cellule di *E.aerogenes* o da cellule ricombinanti di *E.coli* MG1655/pGM716 sovraesprimenti UdP e PNP è stato studiato su una scala di reazione di 1000 litri.



50 kg di pasta cellulare umida ottenute dalla fermentazione di *E.aerogenes* sono stati risospesi in circa 200 litri di tampone fosfato 30 mM a pH 7 e mescolati con 800 litri di tampone fosfato in cui erano stati disciolti a caldo 5,4 kg di adenina (concentrazione finale 40 mM) e 8,9 kg di Ara-U
5 (concentrazione finale 40 mM). La miscela è stata mantenuta a 60°C sotto agitazione per 20 ore, diluita a circa 3000 litri con H₂O calda e diafiltrata su una membrana con cut-off di 50 kDa raccogliendo circa 5000 litri di ultrafiltrato. La resa di bioconversione determinata per RP-HPLC era di circa il 55 %. Il retentato contenente la pasta cellulare viene utilizzato per
10 una successiva reazione. L'ultrafiltrato è stato concentrato a circa 1000 litri e raffreddato per raccogliere il precipitato costituito da Ara-A contaminato dall' adenina non reagita (circa 30 gr di adenina per 100 gr di Ara-A). 5 kg di Ara-A (resa complessiva circa 46 %) con un grado di purezza superiore al 99,5 % erano infine ottenuti dopo due cristallizzazioni da H₂O.
15 5 kg di pasta cellulare umida ottenuta dalla fermentazione del ceppo MG1655/pGM716 sono stati risospesi in circa 20 litri di tampone fosfato 30 mM a pH 7 e mescolati con 980 litri di tampone fosfato in cui erano stati disciolti a caldo 10,1 kg di adenina (concentrazione finale circa 74,6 mM) e 18,3 kg di Ara-U (concentrazione finale circa 74,6 mM). La miscela è stata
20 mantenuta a 60°C sotto agitazione per 4 ore ottenendo una resa di bioconversione di circa il 70%. La soluzione è stata riscaldata a circa 90°C, filtrata a caldo per eliminare le cellule ed il filtrato è stato raffreddato per precipitare Ara-A contaminato da adenina non reagita (circa 20 gr di adenina per 100 gr di Ara-A). 13 kg di Ara-A (resa complessiva 65%) con



un grado di purezza superiore al 99,5% erano infine ottenuti dopo due cristallizzazioni da H₂O.



RIVENDICAZIONI

1. Vettore plasmidico ricombinante comprendente:
 - a) almeno una sequenza genica codificante per un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP; e,
 - 5 b) almeno una sequenza genica codificante per la resistenza ad un antibiotico.
2. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta almeno una sequenza codificante per la resistenza ad un antibiotico è una sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina e/o 10 per la resistenza all'ampicillina
3. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal comprendere sia la sequenza codificante per il polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP che quella codificante per il polipeptide avente l'attività dell'enzima PNP.
- 15 4. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta almeno una sequenza genica codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP e detta sequenza genica codificante per la resistenza alla tetraciclina, sono clonate sul plasmide pUC18.
- 20 5. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 4 caratterizzato dal fatto che detta almeno una sequenza genica codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP è clonata sul plasmide pUC18 in fase di lettura rispetto al promotore *lac*.



6. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta sequenza codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima UdP è la sequenza *udp* di *E.coli*.
7. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal
5 fatto che detta sequenza è EMBL X15689.
8. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta sequenza codificante un polipeptide avente l'attività dell'enzima è la sequenza *deoD* di *E.coli*.
9. Vettore plasmidico secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal
10 fatto che detta sequenza è EMBL M60917.
10. Vettore plasmidico secondo le rivendicazioni 1 e 4 caratterizzato dal fatto che detta sequenza codificante per la resistenza alla tetraciclina è il gene Tc di pBR322.
11. Vettore plasmidico pGM679 (SEQ ID NO 1).
- 15 11. Vettore plasmidico pGM708 (SEQ ID NO 2).
12. Vettore plasmidico pGM678 (SEQ ID NO 3).
13. Vettore plasmidico pGM707 (SEQ ID NO 4).
14. Vettore plasmidico pGM712 (SEQ ID NO 5).
15. Vettore plasmidico pGM716 (SEQ ID NO 6).
- 20 16. Cellule ospiti procariotiche caratterizzate dal fatto di contenere almeno un vettore plasmidico secondo le rivendicazioni 1-15.
17. Cellule ospiti secondo la rivendicazione 16 caratterizzate dal fatto di essere cellule batteriche.
18. Cellule ospiti secondo la rivendicazione 17 caratterizzate dal fatto di
25 essere cellule di *Escherichia coli*.



19. Cellule ospiti secondo la rivendicazione 18 caratterizzate dal fatto di essere cellule del ceppo K12, preferibilmente MG1655 o DH5 α , e/o del ceppo B.
20. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19, sia 5 separatamente che in combinazione, nella produzione di polipeptidi aventi l'attività dell'enzima UdP e/o dell'enzima PNP.
21. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione quali catalizzatori di reazioni di transglycosilazione tra un nucleoside donatore ed una base accettrice.
- 10 22. Uso secondo la rivendicazione 21 caratterizzato dal fatto che detta base accettrice è una base purinica o pirimidinica.
23. Uso secondo la rivendicazione 22 caratterizzato dal fatto che dette basi puriniche o pirimidiniche sono selezionate tra basi pirimidiniche e puriniche naturali o sostituite; basi puriniche sostituite nelle posizioni 1, 2 e 15 6; basi pirimidiniche sostituite in posizione 3 e 5; purina, 2-azapurina, 8-azapurina ed analoghi sostituiti, 1-deazapurina (imidazopiridina), 3-deazapurina, 7-deazapurina ed analoghi sostituiti; triazolo ed analoghi sostituiti; pirazolo ed analoghi sostituiti; composti imidazolici ed analoghi sostituiti.
- 20 24. Uso secondo la rivendicazione 21 caratterizzato dal fatto che detto nucleoside donatore è selezionato tra i nucleosidi naturali o modificati contenenti D-ribosio e 2'-deossiribosio; nucleosidi contenenti il gruppo ribosilico modificato nelle posizioni 2', 3' e 5'; nucleosidi nei quali lo zucchero sia β -D-arabinosio, α -L-xilosio, 3'-deossiribosio, 3'-5'-25 deossiribosio, 2'-3'-dideossiribosio, 5'-deossiribosio, 2'-5'-

A

dideoossiribosio, 2'-ammino-2'-deossiribosio, 3'-ammino-3'-deossiribosio, 2'-fluoro-2'-deossiribosio.

25. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione nella preparazione di analoghi di nucleosidi contenenti sistemi eterociclici con uno o più atomi di azoto in sostituzione di basi puriniche o pirimidiniche.

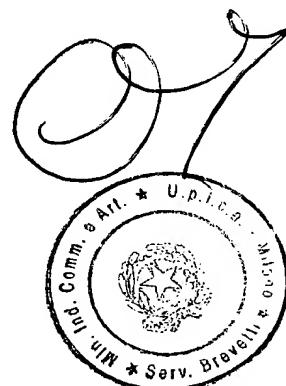
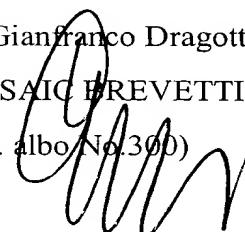
26. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione nella preparazione di zuccheri α-pentosio-1-fosfati mediante reazioni di fosforolisi.

10 27. Uso di cellule ospiti secondo le rivendicazioni 16-19 sia separatamente che in combinazione nella produzione di nucleosidi e di analoghi modificati.

p. Il Mandatario

Ing. Gianfranco Dragotti

15 della SAIC BREVETTI SRL
(Iscri. albo N°300)



M198A002792

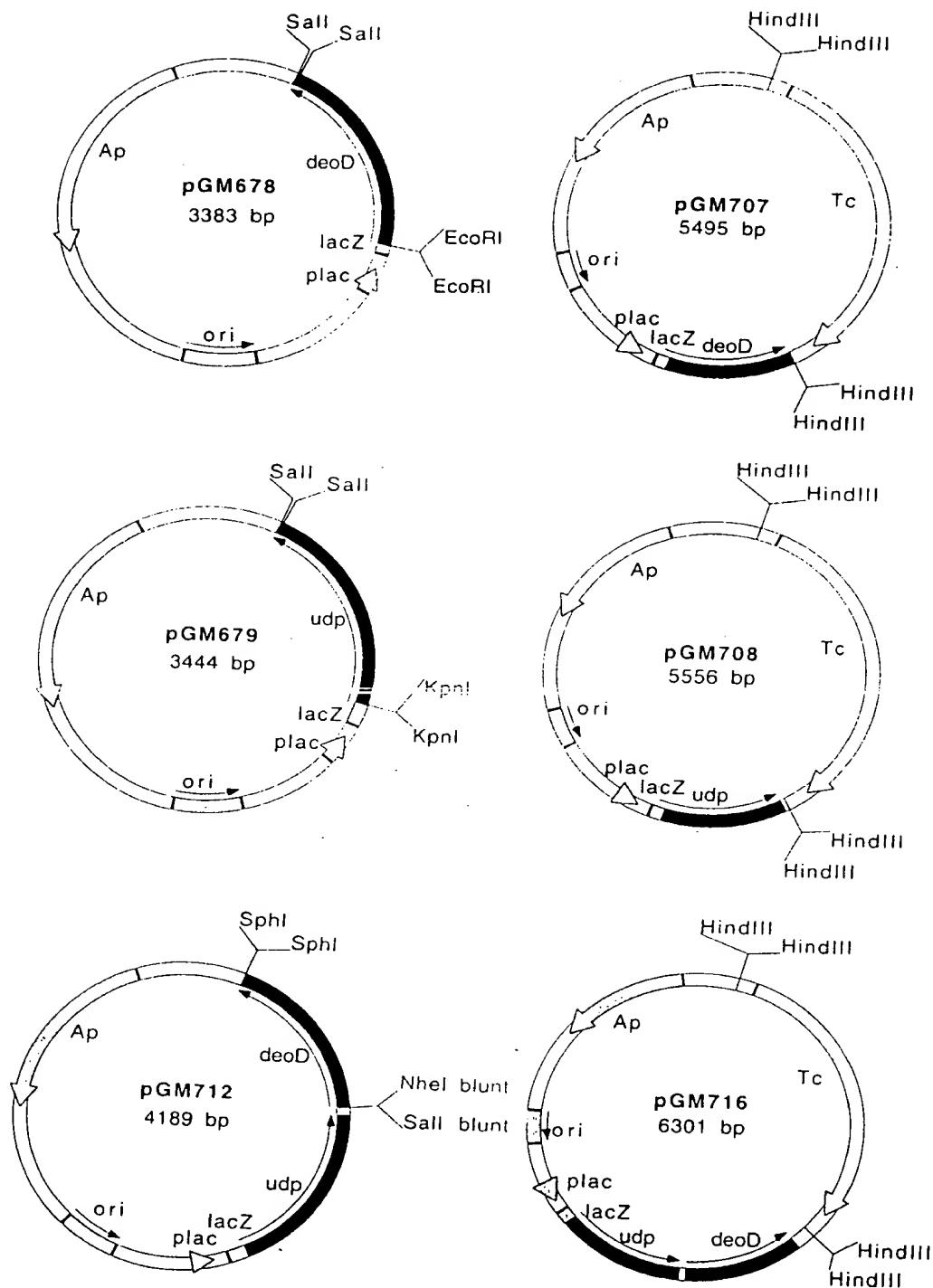
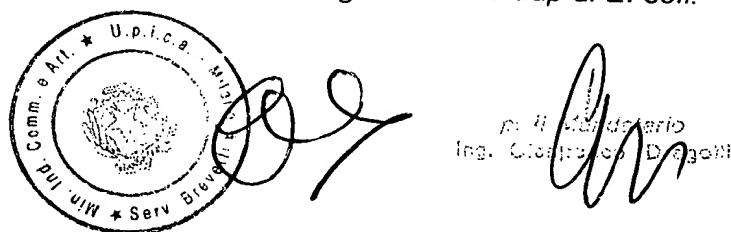


Figura 1. Mappa dei plasmidi in cui sono clonati i geni *deoD* e *udp* di *E. coli*.



pUC18 : 5' - del gene LacZ

pGM678 e pGM707: fusione lacZ-deoD

RBS

ECORI

AGGAAAACAGCT ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCT TCC ATG GCT ACC CCA TGG GCG TAA AGAGTAAGTCGACCTGC . . .
 Leu Val Ile Thr Asn Ser Ser Met Ala Thr Pro Trp Ala Stop

pGM679 e pGM708: fusione lacZ-udp

RBS

KpnI

Sall

AGGAAAGCCT ATG ACC ATG ATT ACG KAP TGT AGC TCG GTA CCA TGC ATG TCC CTG CTG TAA TTCTCTTGTCGCAATG

thr met ile asn ser ser ser val pro ser met ser leu leu stop

pGEM712 e pGEM716: 5' e 3' del gene deOD

Figura 2. Sequenza della fusione al S^+ dei monomeri.

geno è una sequenza di nucleotidi composta da 3 e 3 dei geni *ndp* e *deuD* clonali in pUC18.

Mr. G. C. D. Morgan

FIGURA 3

SEQUENCE LISTING

<110> NORPHARMA SPA

<120> Ceppi batterici ricombinanti per la produzione di nucleosidi naturali e di analoghi modificati

<130> 98DC

MI98A002792

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3444

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

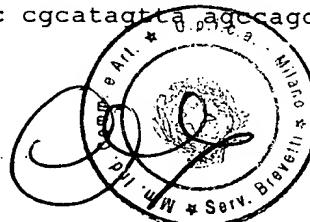
<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM679:
gene udp clonato sul plasmide pUC18

1400V

cgccccata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcataat gcagctggca 60
cgacaggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcacaac gcaattaatg tgagttagct 120
cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgatgt tgtgtgaaat 180
tgtgagcga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cggtaccatc catgtccaag tctgatgtt ttcatctcg cctcaactaaa aacgatttac 300
aaggggctac gcttgccatc gtccctggcg acccggatcg tgtggaaaag atcgccgcgc 360
tgatggataa gccggtaag ctggcatctc accgcgaatt cactacctgg cgtgcagagc 420
tggatggtaa acctgttatac gtctgctcta ccggatcg cggcccgctc acctctattg 480
ctgttgaaga gctggcacag ctggcattc gcaccttcct gcgtatcggt acaacgggcg 540
ctattcagcc gcataattat gtgggtatg tcctggtac cacggcgctc gtccgtctgg 600
atggcgcgag cctgcacttc gcaccgctgg aattcccgcc tgtcgctgat ttcgaatgta 660
cgactgcgct ggttgaagct gcgaaatcca ttggcgcgac aactcacggt ggcgtgacag 720
cttcttctga taccttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggtcgcgtag 780
ttcgtcactt taaagggtct atggaaagagt ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840
tggaatctgc aaccctgctg accatgtgtg caagtcaggg ctcgcgtgcc ggtatggtag 900
cggggttat cgttaaccgc acccagcaag agatcccgaa tgctgagacg atgaaacaaa 960
ccgaaagcca tgcggtgaaa atcgtggtgg aagcggcgcg tcgtctgctg taattctctt 1020
gtcgacctgc aggcatgcaa gcttggcaact ggccgtcgat ttacaacgatc gtgactggga 1080
aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctc tgcaagcacat ccccccggcc ccagctggcg 1140
taatagcgaa gaggccccca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga 1200
atggcgcctg atgcggattt ttctccttac gcatctgtgc ggtatccac accgcataatg 1260
gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcataatgta ~~acc~~ aqccccc qacacccqcc 1320

1



*p: Il Mandatario
Ing. Giuseppe Dragotti*

aacaccggct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc 1380
 tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggtttca cggatcatcac cgaaacgcgc 1440
 gagacaaaag ggcctcgta tacgcatttttca aatgtcatga taataatggt 1500
 ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta tttgtttatt 1560
 tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 1620
 ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgcgcctt ttattccctt 1680
 ttttgcggca ttttgccttc ctgttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga 1740
 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 1800
 gatcctttagt agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt taaaagttct 1860
 gctatgtggc gcggatttat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat 1920
 acactattct cagaatgact tggtagtgc ttcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 1980
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc 2040
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt tgcacaacat 2100
 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcggtt ggaacccggag ctgaatgaag ccataccaaa 2160
 cgacgagcgt gacaccacga tgccctgtac aatggcaaca acgttgcgc aactattaac 2220
 tggcgaacta cttactctag cttccggca acaattaata gactggatgg aggccgataa 2280
 agttgcagga ccacttctgc gtcggccct tccggctggc tggtttattt ctgataaattc 2340
 tggagccggt gaggcgtgggt ctcgcgttat cattgcagca ctggggccag atgtaagcc 2400
 ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 2460
 acagatcgct gagataggtg cctcaactgtat taagcattgg taactgtca accaagttt 2520
 ctcatatata ctttagattt attaaaaact tcattttaa tttaaaagga tctaggtgaa 2580
 gatcctttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt gagttttcg tccactgagc 2640
 gtcagacccc gtagaaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat 2700
 ctgctgctt gaaacaaaaa aaccaccgtt accagcgggtt gtttgggtc cggatcaaga 2760
 gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttagcagcaga ggcgcagatac caaataactgt 2820
 ctttctagtg tagccgttagt taggcacca ctcaagaaac tctgttagcac cgcctacata 2880
 ctcgcctctg gtaatccctgt taccagtggc tgctgcgtt ggcgataagt cgtgtcttac 2940
 cgggttggac tcaagacgt agttaccggta taaggcgcag cggcgggtt gaaacgggggg 3000
 ttcgtgcaca cagcccgat tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 3060
 tgagctatga gaaagcgcac cgttcccgaa agggagaaag gcccgcggat atccgttaag 3120
 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacggag ggagcttcca gggggaaacg cctggatct 3180
 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcg 3240
 agggggccgg agcctatggaa aaaacgcac caacgcggcc ttttacggt tccgtgcctt 3300
 ttgctggcct tttgctcaca tgttttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 3360
 tattaccggc tttgagtgat ctgataccgc tcgcccgcagc cgaacgcaccg agcgcagcga 3420
 gtcagtggc gaggaagcgg aaga 3444

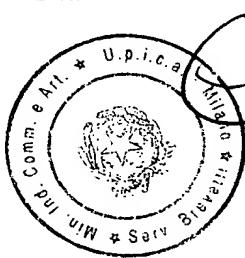


<210> 2
 <211> 5556
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

MIG 8 A 002792

<220>
 <223> Descrizione della sequenza artificiale pGM708:
 gene udp clonato sul plasmide pUC18 insieme al
 gene per la resistenza alla tetracicclina

<400> 2

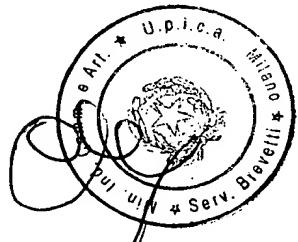


p. d. il destinatario
Ing. Giambattista Dragoli

gcgcccata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcatataat gcagctggca 60
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagtagct 120
caactcattag gcacccagg ctttacactt tatgctccg gctcgatgt tgttgaaat 180
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cggtaccatc catgtccaag tctgatgttt ttcatctcg cctcactaaa aacgattac 300
aaggggctac gcttgcattc gtcctggcg acccgatcg tggaaaag atcggcgcc 360
tcatggataa gccggtaaag ctggcatctc acccgaaatt cactacctgg cgtcagagc 420
tggatggtaa acctgttatac gtctgctcta ccggatcg cggccgtct accttattg 480
ctgttgaaga gctggcacag ctggcattc gcacccctt gctatcggt acaacggcg 540
ctattcagcc gcatattaat gtgggtgatg tcctggttac cacggcgctt gtccgtctgg 600
atggcgcgag cctgcacttc gcaccgctgg aattcccgcc tgcgtctgat ttcaatgta 660
cgactgcgt gttgaagct gcaaaatcca ttggcgcgac aactcacgtt ggcgtgacag 720
cttcttctga taccttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggtcgcgtag 780
ttcgtcaatt taaaggttct atgaaagagt ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840
tggaatctgc aaccctgtg accatgtgtg caagtcaggg cctgcgtgcc ggtatggtag 900
cggtgttat cgttaaccgc acccagcaag agatcccgaa tgctgagacg atgaaacaaa 960
ccgaaagcca tgcggtaaa atcggtgg aagcggcgcc tcgtctgctg taattctt 1020
gtcgacctgc aggcatgaa gctttagt gtaaaccgt ttgtgaaaa aattttaaa 1080
ataaaaaagg ggacctctag ggtcccaat taatttagtaa tataatctat taaaggtcat 1140
tcaaaaggc atccaccgga tcagcttagt aaagccctcg cttagattta atgcggatgt 1200
tgcgattact tcgccaacta ttgcgataac aagaaaaaagc cagccttca tgatatatct 1260
cccaatttgt gtagggctta ttatgcacgc taaaaataa taaaagcaga ctgcacctga 1320
tagttggct gtgagcaatt atgtgcttag tgcatctaac gcttgagtta agccgcggc 1380
cgaacggcg tcggcttga cgaattgtta gacattattt gccgactacc ttggtagtct 1440
cgcccttcac gtagtggaca aattttcca actgatctgc ggcggagat ggcgcgtg 1500
cggctgtgg agatggcgga cgcgtggat atgttctgca aagggttggat ttcycalitc 1560
acagttctcc gcaagaattt attggctcca attcttggag tggtaatcc gttagcgagg 1620
tgccgcggc ttccatttag gtcgaggtgg cccggctcca tgcaccgcga cgcaacgcgg 1680
ggaggcagac aaggtatagg gcggcgcta caatccatgc caaccgttc catgtgctcg 1740
ccgaggcggc ataaatcgcc gtgacgatca gcggtccagt gatcgaagtt aggctggtaa 1800
gagccgcgag cgatccttga agctgtccct gatggtcgtc atctacctgc ctggacagca 1860
tggcctgcaa cgcgccatc ccgatgcgc cggaaagcgag aagaatcata atggggagg 1920
ccatccagcc tcgcgtcgcc aacgccagca agacgtagcc cagcgcgtcg gcccgcattc 1980
cgccgataat gcctgcttc tcgcccggaaac gtttggtagc gggaccagtg acgaaggctt 2040
gagcgaggcc gtgcaagatt ccgaataccg caagcgacag gccgatcatc gtcgcgtcc 2100
agcgaaagcg gtcctcgccg aaaatgaccc agagcgctgc cggcacctgt cctacgagtt 2160
gcatgataaa gaagacagtc ataagtgcgg cgacgatagt catgccccgc gcccaccgga 2220
aggagctgac tgggttgaag gcttcaagg gcatcggtcg acgctctccc ttatgcact 2280
cctgcattag gaagcagccc agtagtaggt tgaggccgtt gagcaccgc gcccgaagga 2340
atggtgcattg caaggagatg ggcggccaa gtcggccctt caccggccct gcccaccatac 2400
ccacggcgaa acaagcgctc atgagcccgaa agtggcgagc ccgatcttcc ccatcggtga 2460
tgtcggtcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc ggtgatgcgg gccacgatgc 2520
gtccggcgta gaggatccac aggacgggtg tggtcgccc gatcggtcgat tggatagttgg 2580
ctccaagtag cgaagcgagc aggactggc ggcggccaaa gcggtcggac agtgcgtccga 2640
gaacgggtgc gcatagaaat tgcatacaacg catatagcgc tagcagcagc ccatagtgac 2700
tggcgatgt gtcggatgg acgatatccc gcaagaggcc cggcagtagcc ggcataacca 2760
agcctatgcc tacagcatcc agggtgacgg tgccgaggat gacgatgagc gcattgttag 2820
atttcataca cggcgcttga ctgcgttagc aatttaactg tgataaacta ccgcattaaa 2880

gctcatgcgg atcagtgagg gtttcaact gcgggtcaag gatctggatt tcgatcacgg 2940
 cacgatcatc gtgcgggagg gcaagggctc caaggatcg ggcttgatgt taccggagag 3000
 cttggcaccc agcctgcgcg agcagggaa ttgatccggt ggatgacctt ttgaatgacc 3060
 tttaatagat tatattacta attaattggg gaccctagag gtcccccttt ttatTTaaa 3120
 aatttttca caaaaacggtt tacaagcata aagcttggca ctggccgtcg ttttacaacg 3180
 tcgtgactgg gaaaacccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atccccctt 3240
 cgccagctgg cgtaatagcg aagaggccc caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag 3300
 cctgaatggc gaatggcgcc tcatgcggta ttttctcctt acgcacatctgt gcggtatttc 3360
 acaccgcata tggtgcaactc tcagttacaat ctgcctgtat gccgcatagt taagccagcc 3420
 ccgacaccccg ccaacaccccg ctgacgcgc ctagcggct tgcacgtcc cggcatccgc 3480
 ttacagacaa gctgtgaccg tctccggag ctgcacatgt cagaggTTTt caccgtcatc 3540
 accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcg gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat 3600
 gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cactttcgg gaaaaatgtgc gcggaaacccc 3660
 tatttttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcacatgac aataacccctg 3720
 ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagttatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 3780
 ccttattccc tttttgcgg cattttgcct tcctgtttt gctcacccag aaacgcgttgt 3840
 gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgatg gtttacatcg aactggatct 3900
 caacagcggg aagatcctt agagtttcg ccccgaaagaa cgTTTccaa tgatgagcac 3960
 ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggattt atccccgtt gacgcggggc aagagcaact 4020
 cggtcgcgcg atacactatt ctcagaatga cttgggttag tactcaccag tcacagaaaa 4080
 gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcgt gctgccataa ccatgagtga 4140
 taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcgaggaa cccgaaggagc taaccgcTTT 4200
 tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ctttgcgtg tgggaaccgg agctgaatga 4260
 agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 4320
 caaactatta actggcgaac tacttactt agcttcccgg caacaattaa tagactggat 4380
 ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct ggcgcggcc ctccggctg gctggTTTat 4440
 tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtcgcgggt atcattgcag cactggggcc 4500
 agatggtaag ccctcccgta tcgttagttt ctacacgacg gggagtcaagg caactatgga 4560
 tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcaactg attaagcatt ggtaactgtc 4620
 agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgattttaaa cttcattttt aattttaaag 4680
 gatcttaggtg aagatcctt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagtttc 4740
 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttctttagt atccTTTTT 4800
 tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccc ctaccagcgg tggTTTgtt 4860
 gcccggatcaa gagctaccaa ctctttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 4920
 accaaatact gtccttctag tgttagccgta gttagggccac cacttcaaga actctgtac 4980
 accgcctaca tacctcgctc tgctaattct gttaccagt gctgctgcc gttggcataa 5040
 gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggcggg 5100
 ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccg cttggagcga acgacactaca ccgaactgag 5160
 atacctacag cgtgagctat gagaagcgc cacgcttccc gaaggggagaa aggccggacag 5220
 gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 5280
 cgcctggat ctttatagtc ctgtcggtt tcgcccaccc tgcacttgagc gtcgattttt 5340
 gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgc gcaacgcgg ctttttacg 5400
 gttccctggcc ttttgcgtgc ctttgcgtca catgttctt cctgcgttat cccctgattc 5460
 tgtggataac cgtattaccg ctttgcgtg agctgataacc gctgcgcgca gccgaacgcac 5520
 cgagcgcacg gagtcagtga gcgaggaagc ggaaga 5556

<210> 3
 <211> 3383



4

M198A002792

P. I. V. Endotarle
Ing. Giuseppe Di Maggio

<212> DNA

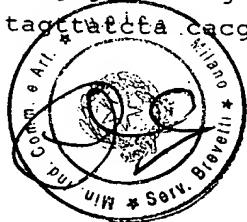
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM678:
gene deoD clonato sul plasmide pUC18

<400> 3

gcgccccata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60
cgacaggttt cccgacttggaa aagcgggcaag tgagcgcaac gcaattaatg tgagtttagct 120
caactcattag gcaccccccagg ctttacactt tatgcttccg gtcgtatgt tgggtggaaat 180
tgtgagcggaa taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcttcca 240
tggctacccc acacattaat gcagaaaatgg gcgatttcgc tgacgttagtt ttgatgccag 300
gchgccccgt gcgtgcgaag tatattgctg aaactttcct tgaagatgcc cgtgaagtga 360
acaacgttcg cggtatgctg ggcttcacccg gtacttacaa aggccgcaaa atttccgtaa 420
tgggtcacgg tatgggtatc ccgtcctgct ccacatcacac caaaagaactg atcaccgatt 480
tcggcgtgaa gaaaattatc cgcgtgggtt cctgtggcgc agttctgccc cacgtaaaac 540
tgcgcgacgt cggtatcggt atgggtgcct gcaccgattc caaaagttaac cgcacatccgtt 600
ttaaagacca tgactttgcc gctatcgctg acttcgacat ggtgcgttaac gcagtagatg 660
cagctaaagc actgggtatt gatgctcgcg tgggttaacct gttctccgtt gacctgttct 720
actctccgga cggcgaaatg ttgcacgtga tggaaaata cggcattctc ggcgtggaaa 780
tggaaagccgc tggtatctac ggctcgctg cagaatttgg cgcgaaagcc ctgaccatct 840
gcaccgtatc tgaccacatc cgcactcacg agcagaccac tgccgctgag cgtcagacta 900
ccttcaacga catgatcaaa atcgactgg aatccgttct gctggcgat aaagagtaag 960
tcgacctgca ggcacatcgaa ctggcactg gccgtcggtt tacaacqtcg tgactggaa 1020
aacccctggcg ttacccaact taatcgctt gcacgacatc ccccttcgc cagctggcg 1080
aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgccgagcct gaatggcgaa 1140
tggcgccctga tgcggatttt tctcccttacg catctgtcg gtatttcaca ccgcataatgg 1200
tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgc 1260
acacccgctg acgcgcctg acgggcttgc ctgctccgg catccgctta cagacaagct 1320
gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggtttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 1380
agacgaaagg gcctcgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgat aataatggtt 1440
tcttagacgt caggtggcac ttttcggggaa aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt 1500
ttctaaatac attcaaataat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa 1560
taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattccctt 1620
tttgcggcat tttgccttcc tggatccatc caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat 1680
gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaa tggatctcaa cagcggtaa 1740
atccttgaga gtttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcactt taaagttctg 1800
ctatgtggcg cggattatc ccgtatttgc gcccggcaag agcaactcgg tcgcccata 1860
caacttctc agaatgactt ggttggatc tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 1920
ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataa cactgcggcc 1980
aacttacttc tgacaacatc cggaggaccg aaggagctaa ccgcctttt gcacaacatg 2040
ggggatcatg taactcgct tgatcggttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 2100
gacgagcgtg acaccacat gcctgttagca atggcaacaa cgttgcgc当地 actattaact 2160
ggcgaactac ttactctagc ttcccgccaa caattaatag actggatgga ggcggataaa 2220
gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggttattgc tgataaatct 2280
ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggatc attgcacgac tggggccaga tggtaagccc 2340
tcccgtatcg tagttatcta caccgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 2400



cagatcgctg agatagggtgc ctcaactgatt aagcattgggt aactgtcaga ccaagttac 2460
 tcatatatatac tttagattga tttaaaaactt cattttaat ttaaaaggat ctaggtgaag 2520
 atcccttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agtttcgtt ccactgagcg 2580
 tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc 2640
 tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgttgc 2700
 ctaccaactc ttttccgaa ggttaactggc ttcagcagag cgcatgatacc aaatactgtc 2760
 cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgttagcacc gcctacatac 2820
 ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgcccagt ggcataagtc gtgtcttacc 2880
 gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcggctg aacgggggt 2940
 tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 3000
 gagctatgag aaagcgccac gttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc 3060
 ggcagggtcg gaacaggaga ggcacggagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 3120
 tatagtcctg tcgggttgc ccacctctga cttgagcgtc gatTTTGTG atgctcgtca 3180
 ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggctt ttttacggtt cctggcctt 3240
 tgctggcctt ttgctcacat gttcttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 3300
 attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga ggcagcggag 3360
 tcagtgagcg aggaagcgga aga 3383

<210> 4

<211> 5495

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

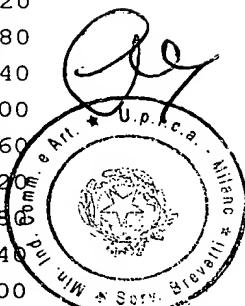
<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM707:gene
decD clonato sul plasmide pUC18 insieme al gene
per la resistenza alla tetraciclini

<400> 4

ggcggccaaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60
 cgacagggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgaac gcaattaatg tgagtttagct 120
 cactcattag gcaccccgagg cttaacactt tatgcttccg gtcgtatgt tgtgtggaat 180
 tgtgagcggtaaacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattttcca 240
 tggctacccca acacattaat gcagaaatgg gcgatttcgc tgacgttagtt ttgatgccag 300
 ggcacccgct gcgtgcgaag tatattgctg aaacttccct tgaagatgcc cgtgaagtga 360
 acaacgttcg cggtatgctg ggttcaccg gtacttacaa aggccgc当地 atttccgtaa 420
 tgggtcacgg tatgggtatc ccgtcctgct ccatctacac caaagaactg atcaccgatt 480
 tcggcgtgaa gaaaattatc cgctgggtt cctgtgcgc agttctgccg cacgtaaaac 540
 tgcgcgacgt cgttatcggt atgggtgcct gcaccgattc caaagttAAC cgcattccgtt 600
 ttaaagacca tgactttgcc gctatcgctg acttcgacat ggtcgtaac gcagtagatg 660
 cagctaaagc actgggtatt gatgctcgcg tggtaacct gttctccgct gacctgttct 720
 actctccggaa cggcggaaatg ttgcacgtga tggaaaaata cggcattctc ggcgtggaaa 780
 tggaaaggcggc tggtatctac ggctcgctg cagaatttgg cggaaagcc ctgaccatct 840
 gcaccgtatc tgaccacatc cgcactcactc agcagaccac tggcgtgag cgtcagacta 900
 cttcaacga catgatcaa atcgcactgg aatccgttct gctggcgat aaagagtaag 960
 tcgacccgtca ggcacgtcaag ctatcgctt gtaaaccgtt ttgtgaaaaa attttaaaa 1020
 taaaaaaggg gacctctagg gtcccaatt aattagtaat ataatctatt aaaggtcatt 1080
 caaaaggtca tccaccggat cagcttagta aagccctcgc tagattttaa tgccgtt 1140

gcatatctc 1200
ccatggctg tagggcttat tatgcacgct taaaataat aaaagcagac ttgacctgt 1260
agtttggctg tgagcaatta tggcttagt gcatctaacc cttgagttaa gccgcgcgc 1320
gaaggcgct cggttgaaac gaattgttag acattatttgc cgactaccc tggatctc 1380
gccttcacg tagtgacaa attcttccaa ctgatctgcg cgccgagatg cgccgcgtgc 1440
ggctgctgga gatggcgac gcatggata tggctgcca agggttgggt tgccattca 1500
cagttctccg caagaattga ttggctccaa ttcttgagt ggtaatccg ttagcgaggt 1560
gccgcggct tccattcagg tcgaggtggc ccggctccat gcaccgcac gcaacgcggg 1620
gaggcagaca aggtataggg cggcgctac aatccatgcc aaccgttcc atgtgtcgc 1680
cgaggcggca taaatcgccg tgacgatcag cggtccagtg atcgaagtta ggctggtaag 1740
agccgcgagc gatccttcaa gctgtccctg atggctgtca tctacctgcc tggacagcat 1800
ggcctgcaac gcgggcattcc cgtgcccggc ggaagcggaga agaatcataa tggggaaaggc 1860
catccagcct cgcgtcgca acggcagcaa gacgtagccc agcgcgtcgg ccgcattgcc 1920
ggcgataatg gcctgcttct cgccgaaacg tttgggtggcg ggaccagtga cgaaggctt 1980
agcgagggcg tgcaagattc cgaataccgc aagcgacagg cccatcatcg tcgcctcca 2040
gcgaaagcgg tcctcgccga aaatgaccca gagcgttgcc ggcacccgtc ctacgagtt 2100
catgataaag aagacagtc taagtgcggc gacgatagtc atgccccggc cccaccggaa 2160
ggagctgact gggttgaagg ctctcaaggg catcggtcga cgctctccct tatgcactc 2220
ctgcattagg aagcagccca gtagtaggtt gaggccgtt agcaccgcgg ccgcaaggaa 2280
tggtgcatgc aaggagatgg cgcccaacag tccccggcc acggggcctg ccaccatacc 2340
cacgcccggaaa caagcgctca tgagcccgaa gtggcgagcc cgttccctt catcggtat 2400
gtcggcgata taggcgccag caaccgcacc tggcgcccg gtatgcggg ccacgatgcg 2460
tccggcgtag aggcatacaca ggacgggtgt ggtcgccatg atcgctgtat cgtatgtgc 2520
tccaagttagc gaagcgagca ggactggcg gcccggaaag cggcggaca gtgctccgag 2580
aacgggtgcg catagaaatt gcatcaacgc atatagcgct agcagcacgc catagtact 2640
ggcgatgtcg tcggaatgya cyalatcccg caagaggccc ggcaatgtaccg gcataacca 2700
gcctatgcct acagcatcca gggtgacggt gcccggatg acgtatgcg cattgttaga 2760
tttcatacac ggtgcctgac tgcgttagca atttaactgt gataaactac cgcattaaag 2820
ctcatgcggc tcaatgtggg tttgcaactg cgggtcaagg atctggattt cgtatcacggc 2880
acgatcatcg tgcggggaggg caagggtctcc aaggatcggg cttgtatgtt acccgagagc 2940
ttggcaccctt ccctgcgcga gcagggaaat tgcgttgcgtt gatgacccctt tgaatgacct 3000
ttaatagatt atattactaa ttaattgggg acccttagagg tccccctttt tattttaaaa 3060
atttttcac aaaacggttt acaagcataa agcttggcac tggccgtcg tttacaacgt 3120
cgtgactggg aaaaccctgg cgttaccctt cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc 3180
gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc 3240
ctgaatggcg aatggcgctt gatcggtat tttctccctt cgcattgtcg cggatattca 3300
caccgcataat ggtgcactt cagtacaatc tgcgtgtat cgcataatc aagccagccc 3360
cgacaccgcg caacaccgc tgacgcggcc tgacgggtt gtcgttcccg ggcattccgt 3420
tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggtttc accgtcatca 3480
ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgat atacgcctt tttataggt taatgtcatg 3540
ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaaccct 3600
atttgtttat ttttctaaat acattcaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga 3660
taaatgcttc aataatattt aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc 3720
cttattccct ttttgcggc attttgcctt cctgttttg ctcacccaga aacgctgggt 3780
aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc 3840
aacagcggtt agatccttga gagtttcgc cccgaagaac gtttccat gatgagcact 3900
tttaaagtgc tgcgtatgtgg cgccgttattt cccgttattt acggcgggca agagcaactc 3960
ggtcgcgcga tacactattt tcagaatgac ttgggtttagt actcaccatg cacaagaaaaq 4020



catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtat 4080
aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgcgttt 4140
ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcggtt gggAACCGGA gctgaatgaa 4200
gccatccaa acgacgacg tgacaccacg atgcctgttag caatggcaac aacgttgcgc 4260
aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg 4320
gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcgcccc ttccggctgg ctggtttatt 4380
gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca 4440
gatggtaagc cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcagc aactatggat 4500
gaacgaaata gacagatgc tgagataggt gcctcaactga ttaagcatg gtaactgtca 4560
gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcatTTTA atttaaaagg 4620
atctaggtga agatccttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagtttgc 4680
ttccactgag cgtagacccc cgtagaaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt 4740
ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaAAA aaaccaccgc taccagcgtt ggTTTGTGG 4800
ccggatcaag agctaccaac tcttttccg aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata 4860
ccaaatactg tcctttagt gttagccgt taggcccacc acttcaagaa ctctgttagca 4920
ccgcctacat acctcgctct gctaattcctg ttaccagtgg ctgctgccaag tggcgataag 4980
tcgtgtctta ccgggttggg ctcaagacga tagttacgg ataaggcgcg 5040
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccacg ttggagcggaa cgacctacac cgaactgaga 5100
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccgg aaggggagaaa ggcggacagg 5160
tatccggtaa gccggcagggt cgaaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac 5220
gcctgggtatc tttatagttc tgtaggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgattttt 5280
tgatgctcgt cagggggcgc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc cttttacgg 5340
ttcctggcct tttgctggcc tttgctcac atgttcttc ctgcgttatac ccctgattct 5400
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcggcag ccgaacgacc 5460
gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaaga 5495

<210> 5

<211> 4189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

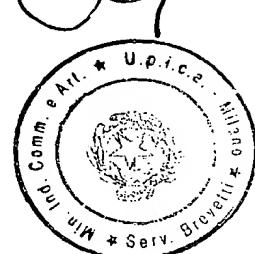
M198A002792

<220>

<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM712:
geni *uidp* e *deoD* clonati sul plasmide *pUC18*

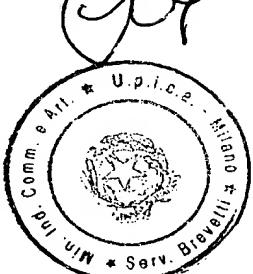
<400> 5

gcggccaaata cgcaaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaaat gcagctggca 60
cgacagggttt cccgacttgg aaggcgccag tgagcgcac gcaattaaatg tgagttatgt 120
caactcattag gcaccccgagg ctttacactt tatgctccg gctcgatgt tggatggaaat 180
tgtgagcggta taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
cggttaccatc catgtccaaag tctgatgttt ttcatctcgg cctcactaaa aacgatttac 300
aaggggctac gcttgcattc gtcctggcg acccgatcg tggaaaag atcggcgcgc 360
tgatggataa gccggtaaag ctggcatctc accgcattt cactacctgg cgtgcagagc 420
tggatggtaa acctgttatac gtctgtctta ccggatcg cggccgcgtt acctctattt 480
ctgttgaaga gctggcacaag ctggcattc gcacccctt gcttgcgtt acaacggcgc 540
ctattcagcc gcatattaaat gtgggtgatg tcctgggtac cacggcgtt gtccgtctgg 600
atggcgcgag cctgcacttc gcaccgctgg aattcccgac tgtagtgcgtat ttcaatgt 660
cgactgcgtt ggttgaagct gcggaaatcca ttggcgcgac aactcacgtt ggcgtgacag 720



[Handwritten signature]

cttcttctga taccttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggtcgcttag 780
 ttgcgtcaatt taaagggttct atggaagagt ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840
 tggaaatctgc aaccctgctg accatgtgtg caagtcaggg cctgcgtgcc ggtatggtag 900
 cgggtgttat cgtaaccgc acccagcaag agatcccga tgctgagacg atgaaacaaa 960
 ccgaaagcca tgcggtgaaa atcgtggtgg aagccgcgc tcgtctgctg taattctctt 1020
 gtcgacttagc aggaggaatt cttccatggc taccacac attaatgcag aaatggcga 1080
 tttcgctgac gtagtttga tgccaggcga cccgctgcgt gcgaagtata ttgctgaaac 1140
 tttccttcaa gatgcccgtg aagtgaacaa cgttcgcggt atgctggct tcaccggta 1200
 ttacaaaggc cgaaaattt ccgtaatggg tcacggtagt ggtatccgt cctgctccat 1260
 ctacaccaaa gaactgatca cgcatttcgg cgtgaagaaa attatccgcg tgggttcctg 1320
 tggcgcagtt ctgcccacg taaaactgcg cgacgtcgat atcggatgg gtgcctgcac 1380
 cgattccaaa gttaaccgc tccgtttaa agaccatgac tttgccccta tcgctgactt 1440
 cgacatggtg cgtaacgcag tagatgcagc taaagcactg ggtattgatg ctcgcgtgg 1500
 taacctgttc tccgctgacc tttctactc tccggacggc gaaatgttcg acgtgatgga 1560
 aaaatacggc attctcgcg tggaaatggg agcggctggt atctacggcg tcgctgcaga 1620
 atttggcgcg aaagccctga ccattctgcac cgtatctgac cacatccgc ctcacgagca 1680
 gaccactgccc gctgagcgtc agactacctt caacgacatg atcaaaatcg cactggaaatc 1740
 cgttctgctg ggcataaaag agtaagtcg cctgcaggca tgcaagcttgcactggccg 1800
 tcggttaca acgtcgtgac tggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccctgcag 1860
 cacatcccccc ttgcgcggc tggcgtaata gcgaagaggc cgcacccat cgcccttccc 1920
 aacagtgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcgt gttttcttc ttacgcata 1980
 tgtgcgttat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagttac aatctgcctt gatggccat 2040
 agttaagcca gccccgacac cgcacac cgcgtacgc gcccgtacgg gcttgcgtgc 2100
 tccccgcata cgcttacaga caagctgtga cgcgtccgg gagctgcata tgcagaggt 2160
 tttcaccgc atcaccgaaa cgcgcgagac gaaaggccct cgtgatacgc ctattttat 2220
 aggttaatgt catgataata atggttttt ayaaytcagg tggcactttt cggggaaatg 2280
 tgcgcggaaac ccctattttt ttattttctt aaatacattt aatatgtat ccgctcatga 2340
 gacaataacc ctgataaaatg cttcaataat attaaaaaag gaagagtatg agtattcaac 2400
 atttccgtgt cgccttattt ccctttttt cggcattttt cttcctgtt tttgctcacc 2460
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgcgt aagatcagtt ggggcacga gtgggttaca 2520
 tcgaactggc tctcaacagc ggtaaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 2580
 caatgatgag cactttaaa gttctgctat gtggcgccgt attatccgtt attgacgcgg 2640
 ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggtt gagtactcac 2700
 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcgtcca 2760
 taaccatgag tgataacact gcccggcaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 2820
 agcttaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgcgtt cgttggaaac 2880
 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgcg agcgtacac cacgtgcctt gtagcaatgg 2940
 caacaacgctt gcgaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 3000
 taatagactg gatggaggcg gataaaatgg caggaccact tctgcgtctg gcccctccgg 3060
 ctggctgggtt tattgctgtt aaatctggag ccggtgagcg tgggtctgcg ggtatcattt 3120
 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgatgat tatctacacg acggggagtc 3180
 aggcaactat ggtgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 3240
 attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattt aaacttctt 3300
 tttaattttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 3360
 aacgtgagtt ttgcgttccac tgagcgtag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 3420
 gagatccctt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcacaa aaaaaaaacca cgcgtaccag 3480
 cggtggtttt tttgcccgtat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 3540
 gcagagcgca gataccaaat actgccttc tagttagcc caccacttca 3600



9 MI 9 8 A 0 0 2 7 9 2

per il Ministero
 Ing. Giuseppe Pescetti

agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg 3660
 ccagtggcga taagtcgtgt ctta cccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 3720
 cgcacggcgc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgaccc 3780
 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgcctt cccgaaggga 3840
 gaaaggcggc caggtatccg gtaagcggca gggtcggaaac aggagagcgc acgagggagc 3900
 ttccaggggg aaacgcctgg tatcttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 3960
 agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcagggg ggcggagcc atggaaaaac gccagcaacg 4020
 cggcctttt acggttcctg gcctttgct ggcctttgc tcacatgttc tttcctgcgt 4080
 tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc 4140
 gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaga 4189

<210> 6

<211> 6301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

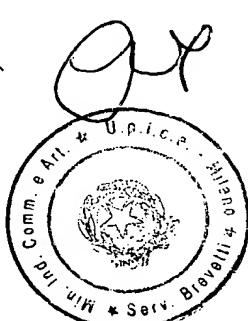
<223> Descrizione della sequenza artificiale pGM716:

geni deoD e udp clonati sul plasmide pUC18
insieme al gene per la resistenza alla
tetraciclina



<400> 6

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaaat gcagctggca 60
 cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgaac gcaattaatg tgagtttagct 120
 cactttagtgcacccagg ctttacaccc tttatgttcgttatgt ttttgttggaaat 180
 tgtgagcggtaaacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattcgagct 240
 cggtaccatc catgtccaag tctgtatgtt ttcatctcgg cctcaactaaa aacgatttac 300
 aaggggctac gcttgccatc gtccttggcg acccggatcg ttggaaaat atgcggcgc 360
 tggatggataa gcccgttaag ctggcatctc accgcgaatt cactacctgg cgtgcagagc 420
 tggatggtaa acctgttatac gtctgtctca cccgtatcgg cggccgtct acctctattt 480
 ctgttgaaga gctggcacag ctggcatttgcacccgttgcgtatcggt acaacggcg 540
 ctattcagcc gcatattaaat gtgggtgatg tcctggttac cacggcgtct gtccgtctgg 600
 atggcgcgag cctgcacttc gcaccgttgc aattcccgcc ttgtcgctgat ttcaatgtt 660
 cgactgcgtt ggttgaagct gcaaatcca ttggcgcgac aactcacgtt ggcgtgacag 720
 cttttctga tacttctac ccaggtcagg aacgttacga tacttactct ggtcgcttag 780
 ttctgtactt taaaggttct atggaaagatg ggcaggcgat gggcgtaatg aactatgaaa 840
 tggaaatctgc aaccctgtcg accatgtgtg caagtcaagg cctgcgtgcc ggtatggtag 900
 cgggtttat cgttaaccgc acccagcaag agatcccgaa tgctgagacg atgaaacaaa 960
 ccgaaagcca tgcggtaaaa atcgtggtgg aagcggcgcg tcgtctgttgc taattctt 1020
 gtcgactagc aggaggaatt cttccatggc taccggcacac attaatgcag aaatggcgaa 1080
 ttgcgttgcgtt gtagtttgcgtt tgccaggcga cccgttgcgtt gcaagtata ttgtgttggaaac 1140
 ttgcgttgcgtt gatgcccgtt aagtgaacaa ctttcgttgcgtt atgctgggtt tcaccggtag 1200
 ttacaaaggc cgcaaaattt ccgtaatggc tcacggatgtt ggtatcccgat cctgttgcgtt 1260
 ctacacccaa gaactgtatca ccgatttcgg cgtgaagaaa attatcccgat tgggttgcgtt 1320
 tggcgcgtt ctggccgcacg taaaactgcg cgacgttgcgtt atcggtatgg gtgcctgcac 1380
 cgattccaaa gtaaccgcgta tccgtttaa agaccatgac tttgcgttgcgtt tggctgtactt 1440
 cgacatggtg cgttaaccgcgtagatgcgttgcgtt ggtattgtatg cttcgctggg 1500

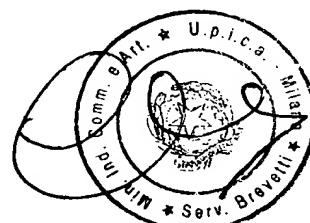


taacctgttc tccgctgacc ttttctactc tccggacggc gaaatgttcg acgtgatgga 1560
aaaatacggc attctcgccg tgaaaatgga agcggcttgt atctacggcg tcgctgcaga 1620
atttggcgcg aaagccctga ccatctgcac cgtatctgac cacatccgca ctcacgagca 1680
gaccactgcc gctgagcgtc agactacctt caacgacatg atcaaaaatcg cactggaatc 1740
cgttctgctg ggcatataaag agtaagtgcg cctgcaggca tgcaagctt atgcttgtaa 1800
accgtttgt gaaaaaattt ttaaaataaa aaaggggacc tctagggtcc ccaattaatt 1860
agtaatataa tctattaaag gtcattcaaa agtcatcca ccggatcagc ttagtaaagc 1920
cctcgctaga tttaatgcg gatgttgcg ttaacttcgaa aactattgcg ataacaagaa 1980
aaagccagcc tttcatgata tatctccca tttgtgttagg gcttattatg cacgcttaaa 2040
aataataaaa gcagacttga cctgatagtt tggctgtgag caattatgtg cttagtgcatt 2100
ctaacgcttgcg agttaagccg cggcgcgaag cggcgtcgcc ttgaacgaat ttttagacat 2160
tatttgcgat ctaccttggat gatctcgcc ttcacgtgtt ggacaaaattt ttcacactga 2220
tctgcgcgccc gagatgcgccc gcgtgcggct gctggagatg gcggacgcga tggatatgtt 2280
ctgccaagggt ttggtttgcg cattcacagt tctccgcaag aattgattgg ctccaattct 2340
tggagtggtg aatccgttag cgagggtccg ccggcttcca ttcaggtcga ggtggcccg 2400
ctccatgcac cgcgacgcaa cgcggggagg cagacaaggt atagggcgcc gcctacaatc 2460
catgccaacc cggtccatgt gtcgcgcag gcggcataaaa tcgcccgtgac gatcagcggt 2520
ccagtgatcg aagtttaggtt ggttaagagcc gcggagcgatc ttttttttttgcg tccctgtatgg 2580
tcgtcatcta cctgccttggat cagcatggcc tgcaacgcgg gcatcccgat gccggccggaa 2640
gcgagaagaa tcataatggg gaaggccatc cagcctcgcc tccgcacgc cagcaagacg 2700
tagcccagcg cgtcggccgc catgccccggcataatggctt gtttttttttgcg gaaacgtttt 2760
gtggccggac cagtgcgaa ggcttgagcg agggcgtgcg agattccgaa taccgcacgc 2820
gacaggccga tcatcgccgc gctccagcga aagcgttccctt ccggaaaat gaccgcacgc 2880
gctggccggca cctgtccatc gagttgcgtatc ataaagaaga cagtacataag tccgcacgc 2940
atagtcatgc cccgcgcaca ccggaaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcattc 3000
ggcgtacgtt ctcccttatg cgtacttcgtt attaggaagc agcccagtag tagtttgagg 3060
ccgttgcgca ccggccgcgc aaggaatggt gcatgcacgc agatggccgc caacagtc 3120
ccggccacgg ggcctgcac cataccacgc ccggaaacaag cgctcatgatccgcgatgg 3180
cgagcccgat ctcccccattc ggtgatgtcg gcatgcacgc cgcacccgttgc 3240
gcgcgggtga tccgcgcac gatgcgtccg gctgtacggat tccacaggac ggttgcgttgc 3300
gccatgtcg cgtactcgat agtggcttca agtagcgaag cgagcaggac tggccggccg 3360
ccaaagcggt cggacagtgc tccgagaacgc ggtgcgcata gaaattgcattt caacgcataat 3420
agcgctacgc gcacgcataatgcgatggc atgctgtcgatggc aatggacgcatgc atccgcacgc 3480
aggcccgca gtaccggcat aaccaaggctt atgcctacag catccagggtt gacgggtccg 3540
aggatgacgc tgagcgcattt gtttagatttca atacacgggtt cctgactgcg ttagcaattt 3600
aactgtgata aactaccgcata ttaaaatgcata tgcggatcgtatc tgagggttttgcg 3660
tcaaggatct ggatttgcgtatc cacggcacgc tcatcgccgc ggagggcaag ggctccaaagg 3720
atcgcccttgcgtatc gagtttgcgtatc caccacggctt ggcgcacgc gggaaatttgcg 3780
ccggccggatgc accttttgcgtatc tgacccgttgcgtatc tagattatataatc ttggggaccc 3840
tagagggttttgcgtatc ttaaaatgcgtatc tttcacaaaaa cgggttgcgtatc gcataaaatgcg 3900
tggacttgcgtatc ctttttttttgcgtatc caacgtcgatc actggggaaaaa ccctggccgtt acccaacttgc 3960
atcgcccttgcgtatc agcacaatccc cttttgcgtatc gctggccgtatc tagcgaagag gcccgcacccg 4020
atcgcccttgcgtatc ccaacagtttgcgtatc cggcgtccgcgtatc atggcgtatc ggcgttgcgtatc 4080
tccttacgcgtatc tctgtgcgtatc atttcacacc gcatatgggtt cactctcgtatc acaatctgcgtatc 4140
ctgtatgcgcgtatc atagttaaatgcgtatc cagccccggatgcgtatc accccgcacgc accccgttgcgtatc 4200
gggcttgcgtatc gctccggca tccgcttacgcgtatc gacaagctgtt gaccgttgcgtatc gggagctgcgtatc 4260
tgtgtcgtatc gtttttgcgtatc tcatcaccgcgtatc aacgcgcgcgtatc acggaaaggccgcgtatc 4320
gccttgcgtatc ataggttaatgcgtatc taatgggtttc ttagacgcgtatc ggtggcacttgcgtatc 4380

ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt 4440
 atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta 4500
 tgagtattca acatttccgt gtcgcctta ttccccttt tgccgcattt tgccctcctg 4560
 ttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac 4620
 gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt ttgcgcgg 4680
 aagaacgtt tccaatgatg agcactttt aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc 4740
 gtattgacgc cggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg 4800
 ttgagtactc accagtcaca gaaaagcata ttacggatgg catgacagta agagaattat 4860
 gcagtgcgtc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg 4920
 gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccctg 4980
 atcggtggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc 5040
 ctgttagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt 5100
 cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaaagt tgcaggacca cttctgcgt 5160
 cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccgggtgag cgtgggtctc 5220
 gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc cctgtatcgta gttatctaca 5280
 cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct 5340
 cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atataactt tagattgatt 5400
 taaaactca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttagt aatctcatga 5460
 cccaaatccc ttaacgtgag tttcggttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca 5520
 aaggatctc ttgagatctt tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa aaaaaaaaaac 5580
 caccgctacc agcggtgggt ttttgcgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 5640
 taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag 5700
 gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacataacct cgctctgcta atcctgttac 5760
 cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttacgg gttggactca agacgatagt 5820
 taccggataa ggccgcagcgg tcggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg 5880
 agnogaacgac ctacacccgaa ctyagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc 5940
 ttcccgagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgg acaggagagc 6000
 gcacgaggga gttccaggg ggaaacgcct ggtatctta tagtcctgtc gggttcgcc 6060
 acctctgact tgagcgtcga ttttgtat gctcgtcagg gggcggagc ctatggaaaa 6120
 acgccagcaa cgccgcctt ttacggttcc tggcctttt ctggccttt gtcacatgt 6180
 tcttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgcctt gagtgagctg 6240
 ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtgac agtgagcgtg gaagcggaaag 6300
 a

6301

M198A002792



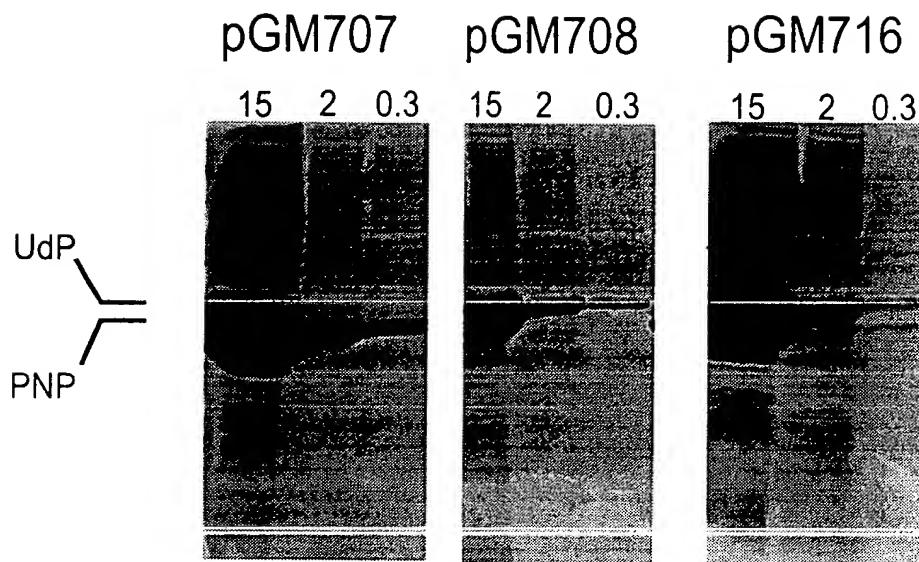
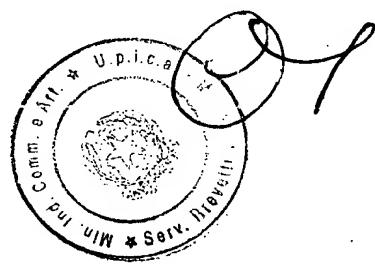


Figura 4. Espressione di PNP e Udp nei ceppi ricombinanti..

Le proteine sono state estratte dai ceppi MG1655/pGM707, MG1655/pGM708 e MG1655/pGM716 cresciuti una notte in LD + tetraciclina (12.5 mg/ml) e separate per elettroforesi su gel di poliacrilamide 15%. Di ogni estratto sono stati caricati rispettivamente 15ml, 2ml e 0.3 ml

MI 98 A 002792



p. li Margherita
Ing. Giacomo Pasotti